

Institut für Zellbiologie
(Tumorforschung)



**Genomweite Genexpressionsanalyse
lasermikrodissektierter L&H-Zellen:
Histogenetischer Ursprung und Pathogenese des
nodulären lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Verena Brune
aus Erlangen

Juni 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Genetik der Universität zu Köln, am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen sowie am Senckenbergischen Institut für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers
2. Gutachterin: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2008

Für Oma und Opa

Abkürzungsverzeichnis

aRNA	<i>antisense</i> RNA
BCR	B-Zellrezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
B-NHL	B-Non-Hodgkin-Lymphom
CB	Zentroblasten
CC	Zentrozyten
cDNA	komplementäre DNA
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CISH	Chromogene <i>in situ</i> Hybridisierung
cRNA	komplementäre RNA
D	Diversitäts-Element der V-Gene
DLBCL	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
EBV	Epstein-Barr Virus
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation
FC	Änderungsverhältnis (<i>fold change</i>)
FDC	follikuläre dendritische Zelle (<i>follicular dendritic cell</i>)
FDR	Falschpositivrate (<i>false discovery rate</i>)
FL	Follikuläres Lymphom
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GCN	Guanidin-Isothiocyanat
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin-Reed/Sternberg
Ig	Immunglobulin
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
J	Verbindungs(<i>joining</i>)-Element der V-Gene
L&H	„ <i>lymphocytic & histiocytic</i> “
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
LMPC	<i>Laser Microdissection and Pressure Catapulting</i>
M	Gedächtnis-B-Zellen (<i>memory</i> B-Zellen)
MACS	magnetische Zellseparation (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	naive B-Zellen
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	noduläres lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
PC	Plasmazellen (<i>plasma cells</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
p-ERK	phosphoryliertes ERK (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
RT	Reverse Transkription
T4 gp32	T4 Gen 32 Protein
TCRBL	T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Variabilitäts-Element der V-Gene
vs	versus

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Die frühe B-Zellentwicklung	1
1.1.1 VDJ-Rekombination	1
1.1.2 Transkriptionsfaktoren-Netzwerke	2
1.2 Der BCR-Signalweg	4
1.3 Die T-Zell-abhängige Immunantwort	4
1.4 B-Zell-Lymphome	5
1.4.1 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)	6
1.4.1.1 Das Burkitt-Lymphom (BL)	6
1.4.1.2 Das Follikuläre Lymphom (FL)	7
1.4.1.3 Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)	8
1.4.1.4 Das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom (TCRBL)	8
1.4.2 Das Hodgkin-Lymphom (HL)	9
1.4.2.1 Das klassische HL (cHL)	10
1.4.2.1.1 Immunhistochemische Analysen des cHL	11
1.4.2.1.2 Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen	11
1.4.2.1.3 Pathogenese des cHL	13
1.4.2.2 Das noduläre lymphozyten-prädominante HL (NLPHL)	20
1.4.2.2.1 Immunhistochemische Analysen des NLPHL	20
1.4.2.2.2 Ursprung und Klonalität der L&H-Zellen	21
1.4.2.2.3 Pathogenese des NLPHL	21
1.5 Affymetrix Microarray-Technologie	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material & Methoden	25
2.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressions-analyse weniger Zellen	25
2.1.1 Zelllinien	25
2.1.1.1 Kultivierung der Zelllinien	25
2.1.1.2 Sortierung der Zelllinien	25

	Seite
2.1.2 Etablierung verschiedener genspezifischer RT-PCRs	25
2.1.3 Etablierung einer RNA-Isolationsmethode ausgehend von geringen Zellmengen	27
2.1.3.1 Nonidet® P40 (NP40) (AppliChem)	27
2.1.3.2 RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	27
2.1.3.3 StrataPrep® Total RNA Microprep Kit (Stratagene)	27
2.1.3.4 Purescript® RNA-Isolation Kit (Gentra)	28
2.1.4 Etablierung einer cDNA-Synthese ausgehend von geringen RNA-Mengen	28
2.1.4.1 Titan™ One Tube RT-PCR Kit (Roche)	28
2.1.4.2 OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)	29
2.1.5 Etablierung eines RNA-Amplifikationsprotokolls zur Verwendung von Affymetrix Microarrays	29
2.1.5.1 Modifizierter SuperSMART® PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech)	29
2.1.5.2 RiboAmp™ Amplification Kit (Arcturus)	31
2.2 Durchflusszytometrische Isolierung normaler B-Zellpopulationen	32
2.3 Lasermikrodissektion	32
2.3.1 Auswahl der Lymphknotenbiopsien von Lymphompatienten	34
2.3.2 Färbung der Gefrierschnitte der Lymphombiopsien	34
2.3.3 Lasermikrodissektion der Lymphomzellen	35
2.4 Genomweite Genexpressionsanalyse	35
2.4.1 RNA-Isolierung für die Genexpressionsanalyse	35
2.4.2 Generierung von cRNA	35
2.4.3 Microarray Hybridisierung, Waschen und Scannen	36
2.4.4 Statistische Analyse der Microarray Daten	36
2.4.4.1 Überprüfung der Microarray Qualität	36
2.4.4.2 Microarray Prä-Prozessierung	37
2.4.4.3 <i>Unsupervised Hierarchical Clustering</i>	37
2.4.4.4 <i>Heatmap</i>	38
2.4.4.5 Differentielle Genexpression	38
2.4.4.6 Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis, PCA</i>)	38
2.4.5 Immunhistochemie	39

	Seite
3. Ergebnisse	40
3.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressions-analyse weniger Zellen	40
3.1.1 Etablierung einer RNA-Isolationsmethode ausgehend von geringen Zellmengen	41
3.1.2 Etablierung einer cDNA-Synthese ausgehend von geringen RNA-Mengen	42
3.1.3 Etablierung eines RNA-Amplifikationsprotokolls zur Verwendung von Affymetrix Microarrays	45
3.1.3.1 Reproduzierbarkeit des Amplifikationsprotokolls	46
3.1.3.2 Reproduzierbarkeit der modifizierten ENZO-Labeling-Reaktion	47
3.1.3.3 Anwendbarkeit des Protokolls auf lasermikrodissektierte Zellen	48
3.1.3.4 Verlässlichkeit des Amplifikationsprotokolls im Vergleich zum Standardprotokoll	49
3.2 RT-PCR-Analysen lasermikrodissektierter primärer HRS-Zellen für HRS-Zell-spezifische Gene	52
3.3 Genomweite Genexpressionsanalyse	54
3.3.1 Genomweite Genexpressionsprofile isolierter L&H-Zellen definieren das NLP HL als eigene Entität, eng verwandt mit TCRBL, einer Untergruppe von DLBCL und cHL	54
3.3.2 Die enge Verwandtschaft von L&H- und HRS-Zellen bestätigt sich in <i>supervised</i> Analysen	57
3.3.3 Nur wenige Gene unterscheiden L&H-Zellen von den Lymphomzellen des TCRBL	59
3.3.4 Identifizierung von L&H-Zell-spezifischen Genen	61
3.3.5 L&H-Zellen zeigen eine ähnliche Verwandtschaft zu GC-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen	64
3.3.6 Vergleich von L&H-Zellen mit GC-B-Zellen	64
3.3.6.1 Differentiell ausgeprägte Gene	64
3.3.6.2 L&H-Zellen zeigen einen partiellen Verlust der B-Zellidentität	65
3.3.6.3 L&H-Zellen zeigen einen anti-apoptotischen Phänotyp und kreieren ein immunsupprimierendes Mikromilieu	68
3.3.6.4 L&H-Zellen sind durch eine starke NF- κ B Aktivität charakterisiert	69
3.3.6.5 ERK-Aktivierung spielt zumindest in einem Teil der NLP HL-Fälle eine Rolle	72
3.3.6.6 Extrazelluläre Matrix (ECM) Degradation und <i>tissue remodeling</i>	73
3.3.7 Validierung der Proteinexpression an primären NLP HL-Fällen	73

	Seite
4. Diskussion	76
4.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressions-analyse weniger Zellen	76
4.2 RT-PCR-Analysen lasermikrodissektierter HRS-Zellen für HRS-Zell-spezifische Gene	77
4.3 Genomweite Genexpressionsanalyse	78
4.3.1 L&H- und HRS-Zellen sind in ihrem Genexpressionsmuster sehr ähnlich	78
4.3.2 Nur wenige Gene unterscheiden L&H-Zellen von den Lymphomzellen des TCRBL	79
4.3.3 L&H-Zellen gleichen GC-B-Zellen im Übergang zu Gedächtnis-B-Zellen	79
4.3.4 L&H-Zellen zeigen einen partiellen Verlust der B-Zellidentität	80
4.3.5 Identifizierung L&H-Zell-spezifischer Gene	81
4.3.6 L&H-Zellen deregulieren Apoptose-Regulatoren	81
4.3.7 L&H-Zellen sind durch eine starke NF- κ B-Aktivität charakterisiert	81
4.3.8 ERK-Aktivierung spielt zumindest in einem Teil der NLPHL-Fälle eine Rolle	82
4.3.9 Extrazelluläre Matrix (ECM) Degradation und <i>tissue remodeling</i>	82
4.3.10 Implikationen für die Pathogenese, Therapie und Diagnose des NLPHL	83
4.4 Ausblick	84
5. Zusammenfassung	86
Abstract	87
6. Literatur	88
7. Anhang	104
Danksagung	105
Publikationen	106
Lebenslauf	107
Erklärungen	108

1. Einleitung

Die epithelialen Oberflächen des Körpers bilden eine schützende Barriere gegen die meisten Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten. Können Pathogene diese Barriere dennoch überwinden und sich im Wirtsgewebe vermehren, ist es die Aufgabe des Immunsystems diese Pathogene zu erkennen, zu eliminieren und somit den Organismus zu schützen.

Die erste Phase der Immunreaktion beruht auf der unspezifischen Induktion der angeborenen Immunität. Diese Antworten werden durch Rezeptoren vermittelt, die entweder nicht klonal oder von sehr begrenzter Vielfalt sind. Phagozyten spielen hierbei eine wichtige Rolle. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren, mit denen sie häufige, konservierte Bestandteile vieler Pathogene erkennen, wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid oder bakterielle DNA.

Eine zweite Phase der Immunantwort, die adaptive Immunität, wird ausgelöst, wenn Pathogene den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität entgangen sind und eine bestimmte Antigenmenge überschritten wird. Hierbei sind vor allem B- und T-Zellen beteiligt. Die Antigene des Pathogens werden von wandernden antigenpräsentierenden Zellen in die lymphatischen Organe transportiert. Dort erkennen T-Zellen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors Antigene, die ihnen durch antigenpräsentierende Zellen in prozessierter Form über den MHC-Komplex (*major histocompatibility complex*) präsentiert werden. B-Zellen erkennen Antigene direkt mittels ihres B-Zellrezeptors (*B cell receptor*, BCR). Die humorale Immunität wird durch die Sezernierung spezifischer Antikörper durch B-Zellen vermittelt. Bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort kommt es zur Interaktion von B-, T- und antigenpräsentierenden Zellen. Während der adaptiven Immunantwort wird - im Gegensatz zur angeborenen Immunität - durch die Bildung antigenproduzierender Plasmazellen und langlebiger Gedächtnis-B-Zellen mit hochaffinen BCR die Fähigkeit entwickelt, schneller und effektiver auf eine erneute Infektion durch bekannte Pathogene zu reagieren.

1.1 Die frühe B-Zellentwicklung

Die B-Lymphozyten des Menschen entstehen während der Embryonalentwicklung in der fötalen Leber und später im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Lymphoide Vorläuferzellen durchlaufen mehrstufige Differenzierungsprozesse, bei denen sowohl die enorme Diversität der Antikörper als auch die Selektion der B-Zellen mit funktionellen nicht autoreaktiven BCR gewährleistet wird (Rajewsky, 1996).

1.1.1 VDJ-Rekombination

Der BCR setzt sich aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten zusammen. Schwere und leichte Ketten besitzen jeweils eine carboxyterminale konstante und eine aminoternale variable Region, welche für die Spezifität des Antikörpers ver-

antwortlich ist. Im Knochenmark wird zu Beginn der B-Zell-Entwicklung die variable Region des Ig-Schwerketten-Lokus durch somatische Rekombinationsprozesse dreier Gen-segmente, den Variablen (V)-, den Diversitäts (D)- und den Verbindungs (*joining*, J)-Gensegmenten, gebildet (Rajewsky, 1996). Bleibt bei der Rekombination das Leseraster erhalten, wird die funktionelle Schwerekette zusammen mit einer Ersatz-Leichtkette und den signaltransduzierenden Molekülen Ig α und Ig β in Form des Prä-B-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche ausgeprägt (Melchers et al., 1995). Die Prä-B-Zelle stoppt weitere Umlagerungsprozesse der Schwerekette, da jede Zelle nur Antigenrezeptoren einer Spezifität ausprägt. Daraufhin beginnen Umlagerungen des Ig-Leichtkettenlokus durch Rekombination der V- und J-Gensegmente (Alt et al., 1987; Rajewsky, 1996; Tonegawa, 1983). Die Antikörperdiversität wird durch die Benutzung verschiedener V-, (D-) und J-Gensegmente erzeugt. Zudem werden an den Verknüpfungsstellen durch Exonukleaseaktivität einzelne Nukleotide abgebaut und durch die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) zusätzliche, nicht Keimbahn-codierte Nukleotide, sog. N-Nukleotide eingebaut (Alt und Baltimore, 1982; Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993; Tonegawa, 1983). Die freie Rekombinierbarkeit von schwerer und leichter Kette trägt weiter zur Diversität der Antikörper bei. So können ca. 10^{13} bis 10^{14} verschiedene BCR gebildet werden (Janeway und Travers, 1997; Sanz, 1991). Nach erfolgreicher Umlagerung des Schwer- und Leichtketten-Lokus prägt die Zelle einen membranständigen BCR auf der Oberfläche aus. Weist der BCR keine Autoreaktivität auf, kann die Antigen-unerfahrene („naive“)-B-Zelle das Knochenmark verlassen und in die Peripherie auswandern (Rajewsky, 1996). Jede B-Zelle weist somit einen einzigartigen BCR auf, der als klonaler Marker benutzt werden kann. Zellen, die keinen funktionellen oder einen autoreaktiven BCR ausprägen, werden im Knochenmark durch Apoptose eliminiert. Autoreaktive B-Zellen können alternativ auch in den Zustand der Anergie verfallen, indem sie für ein Antigen unempfindlich sind (Goodnow et al., 1988).

1.1.2 Transkriptionsfaktoren-Netzwerke

Die frühe B-Zellentwicklung ist ein in hohem Maße durch komplexe Netzwerke von Transkriptionsfaktoren regulierter Prozess (Abb. 1). Die Transkriptionsfaktoren Ikaros und PU.1 regulieren in parallelen Signalwegen die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu lymphoiden Vorläuferzellen, indem sie die Expression wichtiger B-Zellspezifischer Gene aktivieren (Busslinger, 2004). Auch der Transkriptionsfaktor BCL11A (Evi9) spielt eine entscheidende Rolle in der frühen B-Zellentwicklung (Liu et al., 2003). Bislang ist unklar, ob BCL11A vorgeschaltet oder in Kooperation mit E2A agiert. Möglicherweise reguliert BCL11A die B-Zellentwicklung, indem es Notch1 reguliert (Liu et al., 2003).

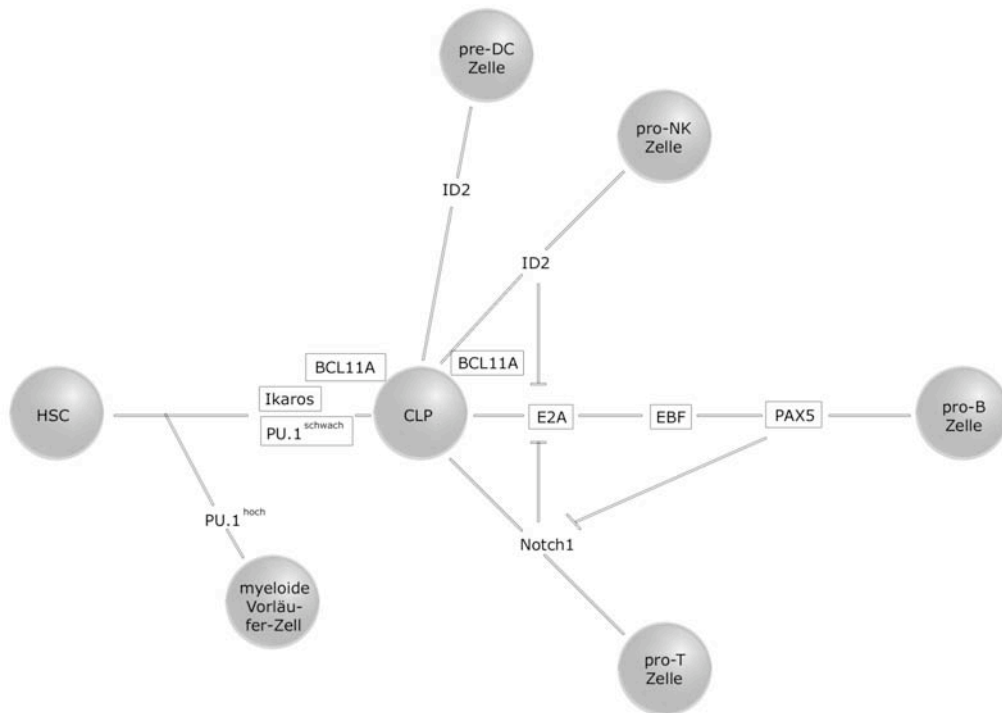


Abbildung 1: Transkriptionelle Kontrolle und Kreuzrepression lymphoider Signalwege

HSC, hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*); CLP, lymphoide Vorläuferzelle (*common lymphoid precursor*); DC, dendritische Zelle (*dendritic cell*); NK, natürliche Killerzelle (*natural killer cell*).

(aus: Busslinger 2004, *Annu Rev Immunol*, 22:55-79, Figure 5; verändert)

Die Differenzierung von lymphoiden Vorläuferzellen zu festgelegten Pro-B-Zellen ist in hohem Maße abhängig von den drei Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 (Busslinger, 2004). E2A reguliert die Expression vieler lymphoider Gene, u.a. induziert E2A die Expression des Transkriptionsfaktors EBF (Nutt und Kee, 2007). Die transkriptionelle Aktivität von E2A kann durch ID2 oder Notch1 inhibiert werden (Busslinger, 2004). Zusammen regulieren E2A und EBF synergistisch die Expression der meisten B-Zell-spezifischen Gene wie, z.B. der surrogaten Leichtkette ($\lambda 5$, Vpr α B), Ig α und Ig β (CD79a und CD79b), sowie die Transkription der RAG1 und RAG2 Einheiten der V(D)J-Rekombinase (Busslinger, 2004; Nutt und Kee, 2007). Dadurch wirken E2A und EBF direkt in der B-Zell-Spezifizierung. Indirekt kontrollieren sie die Determinierung der B-Zellidentität durch Induktion des Transkriptionsfaktors PAX5. PAX5 ist der kritische Faktor in der endgültigen Determinierung der B-Zellidentität, der die Differenzierungsmöglichkeiten früher Vorläuferzellen beschränkt. Dabei aktiviert und verstärkt PAX5 einerseits die Expression B-Zell-spezifischer Gene wie Ig α , CD19, BLNK, AID und IRF8. Auch E2A und EBF werden durch eine Rückkopplungsschleife von PAX5 reguliert (Cobaleda et al., 2007; Nutt und Kee, 2007). Andererseits unterdrückt PAX5 die Aktivität von Signalwegen, die die Differenzierung zu anderen hämatopoetischen Linien begünstigen, wie den T-lymphoide Linien begünstigenden Faktor Notch1 oder das myeloide Zytokin M-CSF (Cobaleda et al., 2007). Die Transkriptionsfaktoren IRF4 und IRF8 kontrollieren die Ter-

mination der prä-BCR-Signaltransduktion durch die Runterregulierung der $\lambda 5$ - und VpräB-Expression, was zur Differenzierung zu kleinen Prä-B-Zellen und zur Initiation von Ig-Leichtketten Genumlagerungen führt (Busslinger, 2004).

1.2 Der BCR-Signalweg

Der BCR setzt sich aus einem membrangebundenen antigenbindenden Immunglobulin und einer signaltransduzierenden Einheit, dem $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b) Heterodimer, zusammen. Einer der ersten Schritte nach Bindung eines Antigens an den BCR ist die Phosphorylierung der Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen (*immunoreceptor tyrosine activation motifs*, ITAMs) von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ durch Mitglieder der Src-Kinase-Familie LYN, BLK, FYN und/oder LCK (Gold, 2002). Die Kinase SYK bindet an phosphorylierte ITAMs und wird durch Src-Kinasen aktiviert. Diese Aktivierungskaskade führt zur Rekrutierung zusätzlicher Effektormoleküle (Geisberger et al., 2003). SYK phosphoryliert und aktiviert das B-Zell-Linkerprotein BLNK. BLNK ist für die BCR-Signaltransduktion essenziell, da es weitere Signalmediatoren, wie die Phospholipase C- $\gamma 2$ (PLCG2), GRB2, VAV und BTK, rekrutiert und durch enge Kolokalisation aktiviert (Wienands und Engels, 2001). Zur optimalen Aktivierung von PLCG2 werden SYK und BTK benötigt. Die aktivierte PLCG2 spaltet Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP_2) in die Signalmediatoren Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG), wodurch die Aktivierung der Proteinkinase C und die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration vermittelt werden (Gold, 2002). Die Aktivierung von PLCG2, PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und VAV führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B, NF-AT und des Ras-ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) Signalweges (Gold, 2002).

Der BCR-Signalweg wird durch diverse Korezeptoren, wie z.B. CD19, CD21, CD22, CD45 und CD72, reguliert (Tsubata und Wienands, 2001). CD19 ist ein positiver Regulator der BCR-Signaltransduktion, der durch die Rekrutierung aktivierter Src-Kinasen, PI3K und VAV wirkt. CD19 interagiert zudem über CD21 mit Komplementfaktoren. CD22 und CD72 sind negative Regulatoren der BCR-Signaltransduktion. Sie rekrutieren Phosphatasen, die zum Abbruch des BCR-Signals führen (Tsubata und Wienands, 2001).

Der BCR-Signalweg vermittelt, abhängig vom Differenzierungsgrad der B-Zelle, der Art des Antigen, der Stärke und Dauer des BCR-Signals, der Signale durch Korezeptoren oder dem Vorhandensein von T-Zellhilfe, verschiedene biologische Reaktionen wie Differenzierung, Proliferation, Anergie und Apoptose (Gold, 2002).

1.3 Die T-Zell-abhängige Immunantwort

Werden im Verlauf der T-Zell-abhängigen Immunreaktion naive B-Zellen durch ihr spezifisches Antigen aktiviert, wandern sie in die B-Zell-Follikel der sekundären lymphatischen Organe ein und bilden dort durch Proliferation Keimzentren (*germinal center*, GC) aus (Wagner und Neuberger, 1996). Hierbei entwickelt sich eine dunkle Zone, die überwie-

gend von CD77-ausprägenden, proliferierenden Zentroblasten (CB) gebildet wird, und eine helle Zone, die aus nicht-proliferierenden Zentrozyten (CC) sowie aus T-Helferzellen, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen (FDC) besteht (Kroese et al., 1990; Stein et al., 1982). Keimzentren sind Orte intensiver B-Zell-Proliferation und somatischer Hypermutation. Durch somatische Hypermutation werden Mutationen mit einer Rate von ca. 10^{-3} Austauschen pro Basenpaar pro Zellgeneration in die V-Region der Ig-Gene eingeführt (Neuberger und Milstein, 1995), wobei die Affinität des BCR zum Antigen verändert wird. Bei den somatischen Mutationen handelt es sich meist um Punktmutationen (Kocks und Rajewsky, 1989), aber auch um Deletionen und Duplikationen (Goossens et al., 1998). Die Mutationen erfolgen nicht zufällig, sondern beschränken sich überwiegend auf umgelagerte V(D)J-Gene und werden bevorzugt in bestimmte Sequenzmotive, sog. „hotspots“ eingeführt (Neuberger und Milstein, 1995; Reynaud et al., 1995; Rogozin und Kolchanov, 1992). Somatisch mutierte CB differenzieren zu CC und wandern in die helle Zone des Keimzentrums ein. Hier konkurrieren sie um die Bindung an das durch FDC präsentierte spezifische Antigen. Keimzentrums-B-Zellen (GC-B-Zellen) regulieren das anti-apoptotische Protein BCL2 herunter, was die Zellen empfindlicher für Apoptose macht (Martinez-Valdez et al., 1996). GC-B-Zellen, die nicht oder nur gering affin gegenüber Antigenen sind, begehen Apoptose (Rajewsky, 1996). Nur Zellen, die positiv durch die Antigenbindung selektioniert werden, überleben die Keimzentrumsreaktion. Neben der Affinitätsreifung ist für die positive Selektion der GC-B-Zellen ebenso die Vermittlung des kostimulatorischen Signals durch CD40 wichtig, einem Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor-(TNFR)-Superfamilie, welches von GC-B-Zellen ausgeprägt wird. Vermutlich wird das Signal hauptsächlich über aktivierte T-Zellen im Keimzentrum vermittelt, die den CD40-Liganden ausprägen. Es wird aber auch diskutiert, dass GC-B-Zellen in der Lage sind, CD40 und CD40-Ligand gleichzeitig auszuprägen (Guzman-Rojas et al., 2002). Man geht davon aus, dass die GC-B-Zellen mehrere Runden der Proliferation, Mutation und Selektion durchlaufen (Rajewsky, 1996). Das Muster der somatischen Mutationen lässt Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad von B-Zellen und ihren Nachfahren zu. B-Zellen mit hochaffinen BCR differenzieren zu langlebigen, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen (MacLennan et al., 1992). Durch den Prozess des Klassenwechsels kann die Effektorfunktion durch den Austausch der konstanten Schwereketten-Region mittels somatischer Rekombination verändert werden, die Spezifität des BCR durch die variable Region bleibt hierbei unverändert (Siebenkotten und Radbruch, 1995; Stavnezer, 1996).

1.4 B-Zell-Lymphome

Maligne Erkrankungen lymphoider Zellen werden als Lymphome bezeichnet. Sie werden nach der WHO-Klassifizierung in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und in Hodgkin-Lymphome (HL) eingeteilt (Jaffe et al., 2001). Die meisten Lymphome (ca. 90% der

NHL) stammen von B-Zellen ab (Fisher, 2003). Da somatisch mutierte V-Gene ein charakteristisches Merkmal von GC-B-Zellen sind, erlaubten Vergleiche der rearrangierten Ig-Gene humaner B-Zell-Lymphome und normaler B-Zellen die Identifizierung des Entwicklungsstadiums der Lymphom-Vorläuferzellen. Die meisten dieser Lymphome stammen von GC-B-Zellen oder deren Nachkommen ab, was den Schluss nahe legt, dass die Entwicklung dieser Lymphome in der Keimzentrumsumgebung erfolgt oder zumindest initiiert wird. Die starke Proliferation der GC-B-Zellen ist ein wichtiges Merkmal, das für sich genommen schon ein hohes Risiko für eine maligne Transformation darstellen kann. Vor allem aber finden während der Keimzentrums-Reaktion genetische Umbauprozesse (somatische Hypermutation und Klassenwechsel) statt, deren Fehlschlagen eine entscheidende Rolle bei der Generation chromosomaler Translokationen und somit der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen spielt (Küppers und Rajewsky, 2003). Während der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels werden DNA-Strangbrüche eingeführt (Bross et al., 2000; Goossens et al., 1998; Papavasiliou und Schatz, 2000). Oft sind Translokationen von Onkogenen in Immunglobulin-Switch-Regionen (Klassenwechsel) oder Immunglobulin-V-Regionen (somatische Hypermutation), wie z.B. die Translokation des c-MYC-Onkogens im Burkitt-Lymphom, Folge dieser Prozesse (Klein et al., 1998; Küppers und Dalla-Favera, 2001). Vermutlich führt der Prozess der somatischen Hypermutation nicht nur zur Entstehung chromosomaler Translokationen, sondern auch zur Einführung von Punktmutationen in einige Nicht-Ig-Gene, sog. aberrante somatische Hypermutation (Küppers, 2005). Somatische Mutationen wurden in BCL6-Genen und CD95-Genen in GC-B-Zellen gefunden (Müschen et al., 2000b; Pasqualucci et al., 1998). Mutationen in weiteren Nicht-Ig-Genen wurden zudem in einigen Fällen von diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) und einigen AIDS-assoziierten NHL gefunden (Gaidano et al., 2003; Pasqualucci et al., 2001).

1.4.1 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-NHL)

B-Zell-NHL werden in indolente, langsam verlaufende Erkrankungen wie beispielsweise das FL und in aggressive Erkrankungen wie das BL und das DLBCL eingeteilt. Einige der wichtigsten B-NHL-Entitäten werden im Folgenden beschrieben.

1.4.1.1 Das Burkitt-Lymphom (BL)

Das BL ist ein hoch aggressiver B-Zelltumor, der eine der höchsten Zellteilungsraten unter humanen Tumoren aufweist (Hecht und Aster, 2000). Das BL wird in drei Formen unterteilt: Die endemische Form betrifft hauptsächlich Kinder und junge Erwachsene in Afrika und ist in über 95% der Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert. Im Gegensatz dazu ist das sporadische BL, das meist Erwachsene in Europa und Nordamerika betrifft, meistens EBV negativ. Ein dritter Typ des BL ist bei *human immunodeficiency virus* (HIV)-infizierten Erwachsenen häufig und ebenfalls meist EBV negativ. Das BL stammt

von GC-B-Zellen ab. Die Tumorzellen prägen die B-Zell-spezifischen Marker CD19, CD20, IgM, Ig κ oder Ig λ und CD10 aus (Hecht und Aster, 2000). Sequenzanalysen von IgH- und IgL-Ketten Genen in endemischen, sporadischen und HIV-assoziierten BL haben gezeigt, dass die Tumorzellen hypermutierte Ig-Gene tragen. Ig-Gene einiger endemischer BL zeigen zudem Hinweise auf andauernde somatische Hypermutation (Chapman et al., 1998; Eclache et al., 1996; Jain et al., 1994). Das BL ist ausnahmslos mit chromosomalen Translokationen assoziiert, welche die Expression des Onkogens c-MYC deregulieren. Der Translokationspartner für c-MYC ist der Ig-Lokus (Hecht und Aster, 2000; Lindström und Wiman, 2002). Das weitere Fortschreiten der Tumorentwicklung beinhaltet die Selektion zusätzlicher genetischer und epigenetischer Veränderungen, die den p53 Tumorsuppressorsignalweg betreffen, einschließlich p53 Mutationen, Überexpression von MDM2 und Inaktivierung des p14ARF-Lokus durch Promotormethylierung (Lindström und Wiman, 2002).

1.4.1.2 Das Follikuläre Lymphom (FL)

Das FL ist das zweithäufigste B-Zell-NHL und macht ca. 20% aller Fälle aus (Armitage und Weisenburger, 1998). Der klinische Verlauf des FL ist variabel. Bei einigen Patienten ist das Fortschreiten der Krankheit über viele Jahre hinweg langsam und indolent, bei anderen Patienten zeigt sich ein rapides Fortschreiten, oft mit einer Transformation in ein aggressives Lymphom wie dem DLBCL, mit einem schnellen tödlichen Krankheitsverlauf (Bastion et al., 1997; Horning, 2000; Johnson et al., 1995). Das FL stammt von GC-B-Zellen ab. Die Tumorzellen tragen somatisch mutierte Ig-Gene und zeigen aktive somatische Hypermutation, was zu intraklonaler Diversität der Tumorzellen führt (Bahler und Levy, 1992). FL zeigen in der Mehrzahl der Fälle ein follikuläres Wachstum, welches der Architektur reaktiver, nicht-maligner Keimzentren ähnelt. Die zelluläre Zusammensetzung der FL ist ebenfalls ähnlich der reaktiver Keimzentren, bestehend aus zentrozyten- und zentroblastenähnlichen Zellen, reaktiven T-Zellen, follikulären dendritischen Zellen und einigen Makrophagen (Harris und Ferry, 1992). Es gibt Hinweise darauf, dass die Tumorzellen des FL von Signalen ihrer umgebenden, nicht-malignen Zellen abhängig sind (Freedman et al., 1994; Martin et al., 1999; Oeschger et al., 2002; Su et al., 2001; Umetzu et al., 1990). Genexpressionsanalysen, die mit dem Ziel durchgeführt wurden prognostische Signaturen zu identifizieren, zeigten, dass die Aggressivität des FL hauptsächlich vom zellulären Infiltrat abhängig ist (Dave et al., 2004). Die molekulare Basis der malignen Transformation im FL ist die Translokation des Onkogens BCL2 in den IgH-Lokus während der V-Genrekombination in der frühen B-Zellentwicklung (Gaulard et al., 1992; Tsujimoto et al., 1985). Die Translokation bietet den Tumovorläuferzellen Schutz vor Apoptose, besonders während der Selektion im Keimzentrum. Die Deregulation der BCL2 Expression allein scheint allerdings nicht ausreichend, um die maligne Transformation der Zellen auszulösen (Limpens et al., 1995; Strasser et al., 1990).

1.4.1.3 Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Die Entität des DLBCL ist eine sehr heterogene Gruppe von Lymphomen. Sie umfasst zahlreiche morphologische Varianten, wie das immunoblastische, das zentroblastische, das anaplastisch-großzellige B-Zell-Lymphom, das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom sowie das Primäre Medastinale B-Zell-Lymphom (Gatter und Warnke, 2001). DLBCL machen ca. 31% der B-Zell-NHL aus (Fisher, 2003). Patienten mit DLBCL zeigen einen sehr variablen klinischen Verlauf. Zwar sprechen die meisten Patienten zunächst auf Chemotherapie an, aber trotz zahlreicher Versuche Therapien zu verbessern, können auch heute nur 35–40% der Patienten dauerhaft geheilt werden (Alizadeh et al., 2000; Coiffier, 2001). Anhand von Genexpressionsanalysen ist es gelungen, Subgruppen des DLBCL zu identifizieren, die eine gute Korrelation zum klinischen Verlauf aufweisen (Alizadeh et al., 2000), auch wenn diese molekulare Einteilung nicht immer mit der morphologisch-pathologischen übereinstimmt (Rosenwald et al., 2002). Somit konnte eine Methode entwickelt werden, mit der die Wahrscheinlichkeit des Überlebens für DLBCL-Patienten nach einer Chemotherapie basierend auf dem Muster der Genexpression vorausszusehen ist (Rosenwald et al., 2002). So fanden Alizadeh et al. einen Subtyp, der Gene ausprägt, die charakteristisch für GC-B-Zellen sind (GC-DLBCL). Der zweite Subtyp prägt Gene aus, die während der *in vitro* Aktivierung peripherer Blutzellen induziert werden (ABC-DLBCL). Patienten mit GC-DLBCL haben eine bessere Prognose als ABC-DLBCL-Patienten (Alizadeh et al., 2000). Beide Subtypen weisen somatisch mutierte Ig-Gene auf, jedoch ist der Prozess der somatischen Hypermutation nur noch im GC-DLBCL aktiv (Lossos et al., 2000). Etwa ein Drittel der DLBCL-Fälle weist eine Translokation des BCL6 Gens, einem Transkriptionsrepressor, auf, die in einer konstitutiven Expression des BCL6 Gens resultiert. Dadurch wird vermutlich eine terminale Differenzierung der B-Zellen verhindert (Staudt et al., 1999). Das BCL6 Protein ist interessanterweise in der Mehrzahl der Fälle nachzuweisen, unabhängig davon, ob es sich um ein GC-DLBCL oder ein ABC-DLBCL handelt (Huang et al., 2002). Array-CGH (Comparative Genomische Hybridisierung) Analysen haben gezeigt, dass das ABC-DLBCL genomisch durch Zugewinne von 3q, 18q und 19q sowie Verlusten von 6q und 9p21 charakterisiert ist, während das GC-DLBCL durch Zugewinne von 1q, 2p, 7q und 12q gekennzeichnet ist. Der Verlust von 9p21 (p16^{INK4a}-Lokus) kennzeichnet die aggressivsten DLBCL-Fälle. Dies lässt die Autoren vermuten, dass sich GC-DLBCL und ABC-DLBCL aufgrund unterschiedlicher pathogener Mechanismen entwickeln (Tagawa et al., 2005).

1.4.1.4 Das T-Zell-reiche B-Zell-Lymphom (TCRBL)

Das TCRBL stellt eine morphologische Variante des DLBCL dar (Gatter und Warnke, 2001). Es wurde 1988 erstmals als eigenständige Entität beschrieben (Ramsay et al., 1988). TCRBL wird meist in einem späten Stadium diagnostiziert und weist einen aggressiven Verlauf auf (Boudová et al., 2003). Es ist durch wenige einzeln liegende maligne B-

Zellen charakterisiert, die in einem Infiltrat von nicht-malignen polyklonalen T-Zellen, Histiozyten und Plasmazellen liegen. Der Anteil der T-Zellen kann von 50% bis 90% variieren. TCRBL zeigt meist ein diffuses Wachstumsmuster, einige Fälle können aber auch ein noduläres Wachstum aufweisen (Baddoura et al., 1995). Die CD20 positiven Tumorzellen stammen von mutierenden GC-B-Zellen ab (Bräuninger et al., 1999b) und können sowohl Zentroblasten oder Immunoblasten ähneln als auch Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen oder L&H (lymphocytic & histiocytic) Zellen des Hodgkin Lymphoms (HL) (Camilleri-Broet et al., 1996). In einigen Fällen ist die Unterscheidung zum nodulären lymphozyten-prädominanten HL (NLPHL) besonders schwierig, da beide Lymphome Gemeinsamkeiten in wichtigen morphologischen und immunphänotypischen Merkmalen zeigen. Da sich TCRBL und NLPHL aber grundlegend in Therapie und Verlauf unterscheiden, ist die Differentialdiagnose sehr wichtig (De Jong et al., 1996). TCRBL und NLPHL kommen nicht nur als Kombinationslymphome im selben Lymphknoten oder in verschiedenen Biopsien, sondern auch familiär gehäuft vor (Rüdiger et al., 2002). Beide Lymphome sind durch eine Prädominanz bei männlichen Patienten gekennzeichnet (Achten et al., 2002). Das Durchschnittsalter ist bei TCRBL-Patienten zum Zeitpunkt der Erkrankung etwas höher als bei NLPHL-Patienten (Franke et al., 2002). Zusammen mit den morphologischen und immunphänotypischen Ähnlichkeiten führte dies zu Spekulationen, dass es sich beim TCRBL um ein transformiertes NLPHL handelt (De Jong et al., 1996; Shimodaira et al., 2000). CGH Analysen haben zwar einige Gemeinsamkeiten zwischen TCRBL und NLPHL gezeigt, aber auch viele Unterschiede. TCRBL zeigten nicht nur eine geringere Anzahl an chromosomalen Zugewinnen und Verlusten, sondern auch eine unterschiedliche Verteilung (Franke et al., 2002). Diese Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, dass NLPHL in TCRBL transformiert, denn das Konzept, dass die karyotype Evolution maligner Zellen mit einer Zunahme von genetischen Aberrationen und zunehmender Komplexität der chromosomalen Veränderungen einhergeht, würde ein komplexeres Muster beim TCRBL im Vergleich zum NLPHL voraussetzen.

1.4.2 Das Hodgkin-Lymphom (HL)

Das HL wurde von Thomas Hodgkin 1832 erstmals beschrieben (Hodgkin, 1832) und später von Sternberg (Sternberg, 1898) und Reed (Reed, 1902) weitergehend charakterisiert. Das HL ist mit einer Inzidenz von ca. 2–4 pro 100.000 eine eher seltene Erkrankung, jedoch mit einem Anteil ca. 30% eine der häufigsten malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems in der westlichen Welt. Biologische und klinische Studien haben gezeigt, dass das HL zwei verschiedene Entitäten umfasst: das klassische (cHL), das ca. 95% aller HL ausmacht, und das noduläre lymphozyten-prädominante HL (NLPHL). Das Charakteristikum beider Entitäten des HL sind die wenigen großen neoplastischen Zellen (die HRS-Zellen des cHL bzw. die L&H-Zellen des NLPHL) in einem zellulären Infiltrat nicht-neoplastischer Zellen (Jaffe et al., 2001). Die HRS bzw. L&H-Zellen machen in der

Regel weniger als 1% des infiltrierenden Gewebes aus (Hansmann et al., 1999; Weiss et al., 1999). NLPHL und cHL unterscheiden sich aber u.a. in Epidemiologie, Immunphänotyp sowie klinischen und genetischen Eigenschaften.

Die klinischen Symptome des HL sind vielfältig. Die meisten Patienten weisen einen vergrößerten, aber sonst asymptomatischen Lymphknoten auf, der typischerweise im unteren Halsbereich oder in der Supraclavicularregion (Grube oberhalb des Schlüsselbeins) lokalisiert ist. Bei ca. 25% der Patienten treten zusätzlich systemische Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß auf (Yung und Linch, 2003). Aufgrund moderner Therapiekonzepte ist das HL mittlerweile unabhängig vom Subtyp bei den meisten Patienten gut therapier- und heilbar (Jaffe et al., 2001). Auf die operative Entfernung des betroffenen Lymphknotens folgt beim NLPHL eine Bestrahlung der involvierten Körperregion. Das cHL wird meist durch eine Kombination aus Chemotherapie und Bestrahlung behandelt (Yung und Linch, 2003).

Das Vorliegen einer genetischen Disposition wird aufgrund des gehäufteten Auftretens des HL in einigen Familien und des 99-fach erhöhten Risikos einer Erkrankung unter eineiigen Zwillingen vermutet (Grufferman und Delzell, 1984; Mack et al., 1995). Weiterhin zeigt sich in epidemiologischen Studien eine Abhängigkeit des Erkrankungsrisikos von Geschlecht, sozialem Lebensstandard und ethnischem Hintergrund (Gutensohn und Cole, 1980).

1.4.2.1 Das klassische HL (cHL)

Das cHL wird in vier Subtypen unterteilt: nodulär sklerotisierend (*Nodular Sclerosis*, NS; 60-80% der cHL), mischzellig (*Mixed Cellularity*, MC; 15-30% der cHL), lymphozytenarm (*Lymphocyte Depletion*, LD; 1% der cHL) und lymphozytenreiches klassisches HL (*lymphocyte-rich classical*, lrcHL; 6% der cHL) (Harris, 1999). Die HRS-Zellen sind um ein Vielfaches größer als Lymphozyten. Sie haben deutlich ausgeprägte Nucleoli und reichhaltiges Zytoplasma. Ein Teil der Zellen ist mehrkernig. Die HRS-Zellen liegen eingestreut in ein Infiltrat von nicht-malignen CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Plasmazellen (Burke, 1992; Hansmann et al., 1999; Weiss et al., 1999).

Das cHL weist in der westlichen Welt eine bimodale Häufigkeitsverteilung mit einem ersten stärkeren Maximum bei ca. 25 Jahren und einem zweiten schwächeren Maximum bei ca. 60 Jahren auf (Glaser und Jarrett, 1996). In Entwicklungsländern zeigt sich zwar auch eine bimodale Altersverteilung, die beiden Maxima liegen jedoch zum einen bei Kindern und zum anderen bei älteren Erwachsenen (Mueller und Grufferman, 1999). Während die NS gehäuft bei jungen Erwachsenen auftritt, sind Kinder und ältere Erwachsene vor allem vom MC betroffen (Mueller und Grufferman, 1999).

1.4.2.1.1 Immunhistochemische Analysen des cHL

HRS-Zellen weisen einen ungewöhnlichen und inkonsistenten Immunphänotyp auf, der keinem hämatopoetischen Zelltyp entspricht, was dazu führte, dass die Herkunft der HRS-Zellen lange Zeit Gegenstand der Diskussion war. Obwohl die HRS-Zellen in fast allen Fällen von B-Zellen abstammen (siehe Kapitel 1.4.2.1.2), prägen die HRS-Zellen nur wenige B-Zellmarker, wie BSAP/Pax5, aus (Drexler, 1992; Foss et al., 1999; Kuzu et al., 1993; Re et al., 2001; Schwering et al., 2003a; Stein et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Gleichzeitig prägen die HRS-Zellen aber Marker aus, die spezifisch für andere hämatopoetische Linien sind. Beispielsweise exprimieren sie CD15, einen Granulozyten- und Monozytenmarker (Drexler, 1992), Restin, TARC (*thymus and activation regulated chemokine*) und Fascin als Marker für dendritische Zellen (Delabie et al., 1992; Pinkus et al., 1997; van den Berg et al., 1999) und in einigen Fällen auch die cytotoxischen T-Zellmarker TIA-1 (*T-cell intracellular antigen-1*) und Granzyme B (Kanavaros et al., 1999; Krenacs et al., 1997; Oudejans et al., 1996). Die Anzahl der ausgeprägten Marker und auch die Anzahl der HRS-Zellen eines Falles, die diese Marker ausprägen, variiert stark. HRS-Zellen sind in fast allen Fällen positiv für CD30, einem Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor-(TNFR)-Superfamilie, so dass dieser Marker zur immunhistochemischen Diagnose des cHL genutzt wird (Drexler, 1992; Jaffe et al., 2001).

1.4.2.1.2 Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen

Über die zelluläre Abstammung und die Klonalität der HRS-Zellen wurden über Jahre hinweg sehr kontroverse Diskussionen geführt. Durch die geringe Anzahl der HRS-Zellen im Tumorgewebe und die Schwierigkeit bei der Isolierung von HRS-Zellen (Sitar et al., 1989; Sundeen et al., 1987), waren klassische molekularbiologische Methoden wie Southern Blot Hybridisierung und Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) aus Ganzschnitt-DNA ungeeignet und führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Küppers et al., 1995). Eine weitere Schwierigkeit stellte die Tatsache dar, dass die HRS-Zellen morphologisch und immunphänotypisch keinem der bekannten hämatopoetischen Zelltypen gleichen ((Drexler, 1993; Trümper et al., 1993); vgl. Kapitel 1.4.2.1.1)). Erst spätere Arbeiten, in denen HRS-Zellen durch Mikrodissektion aus Gewebeschnitten isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein von Ig-Genumlagerungen untersucht wurden, bestätigten das Vorhandensein klonaler Ig-Genumlagerungen in den HRS-Zellen (Bräuninger et al., 1999a; Hummel et al., 1996; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1994; Küppers und Rajewsky, 1998; Küppers, 1999a; Küppers et al., 1999b; Marafioti et al., 2000; Staudt, 2000; Vockerodt et al., 1998) und definieren die Vorläuferzelle der HRS-Zellen somit als B-Zelle. Sequenzanalysen der V-Genumlagerungen zeigten somatische Mutationen (Küppers et al., 1994; Küppers, 2002). Da somatische Mutationen während der Keimzentrumsreaktion durch die somatische Hypermutation eingeführt werden, identifizieren sie die Vorläuferzelle der

HRS-Zellen demnach als GC-B-Zelle (Küppers et al., 1993). Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion unterliegen die B-Lymphozyten dem starken Selektionsdruck, einen hochaffinen BCR zum Antigen zu erzeugen. B-Lymphozyten ohne funktionellen und hochaffinen BCR werden normalerweise sehr schnell und effizient durch Apoptose eliminiert (siehe Kapitel 1.1; (Lam et al., 1997)). Erstaunlicherweise fanden sich aber in ca. 25% der analysierten cHL-Fälle inaktivierende Mutationen wie Stop-Codons, Deletionen oder Insertionen, die zur Verschiebung des Leserasters führten oder Mutationen, die zur Inaktivierung des V-Genpromotors führten (Jox et al., 1999; Kanzler et al., 1996a; Küppers, 2002; Müschen et al., 2000a). Durch die Existenz solcher „verkrüppelnder“ Mutationen können die HRS-Zellen keinen funktionellen BCR ausprägen und müssen durch die transformierenden Ereignisse eine Möglichkeit erhalten haben, der Apoptose zu entgehen. Da offensichtliche Mutationen wie Stop-Codons etc. nur einen kleinen Teil der möglichen „verkrüppelnden“/inaktivierenden Mutationen ausmachen (inaktivierende Mutationen sind z.B. auch Aminosäureaustausche, die zu verminderter Affinität oder Veränderungen bei der Peptidfaltung führen), kann davon ausgegangen werden, dass HRS-Zellen generell von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen (Kanzler et al., 1996b; Küppers und Rajewsky, 1998).

Einen weiteren Hinweis auf transformierende Ereignisse in HRS-Zellen während der Keimzentrumsreaktion lieferte die Analyse von Kombinationslymphomen, in denen bei Patienten das gleichzeitige Vorkommen eines cHL und eines B-Zell-NHL beobachtet wurde. Sequenzanalysen der V-Genumlagerungen zeigten, dass jeweils die malignen Zellen beider Tumore klonal verwandt waren. Da sich sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Punktmutationen, die nur in den HRS-Zellen oder den Zellen des B-Zell-NHL vorkamen, nachweisen ließen, liegt der Schluss nahe, dass sich beide Lymphome von einer gemeinsamen Vorläuferzelle aus dem Keimzentrum ableiten (Bräuninger et al., 1999a; Küppers et al., 2001; Marafioti et al., 1999; Tinguely et al., 2003; van den Berg et al., 2002).

Wie in Kapitel 1.4.2.1.1 beschrieben prägen die HRS-Zellen in ca. 10-15% der cHL Fälle T-Zellmarker wie CD3, Granzyme B, TIA-1 und/oder Perforin aus (Felgar et al., 1997; Foss et al., 1996; Krenacs et al., 1997; Küppers, 2002; Oudejans et al., 1996). Um zu überprüfen, ob HRS-Zellen nicht doch in einzelnen Fällen von T-Lymphozyten abstammen, wurden 17 cHL, die mehrere T-Zellmarker ausprägen, auf T-Zellrezeptor-Genumlagerungen untersucht. Nur in drei dieser Fälle wurden klonale T-Zellrezeptor-Genumlagerungen, bei gleichzeitigem Fehlen von Ig-Genumlagerungen nachgewiesen. In den anderen Fällen stammen die HRS-Zellen jedoch trotz T-Zell-Phänotyp von B-Zellen ab (Müschen et al., 2000a; Seitz et al., 2000). Da cHL nur selten mehrere T-Zellmarker ausprägen, schätzt man den Anteil der Fälle mit T-Zellrezeptor-Genumlagerungen auf unter 5% (Müschen et al., 2000a).

1.4.2.1.3 Pathogenese des cHL

Epstein-Barr Virus (EBV) und andere Viren

EBV ist ein γ -Herpesvirus, mit dem mehr als 95% der weltweiten Bevölkerung infiziert sind. Der Virus infiziert hauptsächlich B-Zellen und entwickelt in diesen eine lebenslange Persistenz (Rickinson und Kieff, 2001). Üblicherweise erfolgt die primäre Infektion mit EBV im Kindesalter und verläuft gewöhnlich asymptomatisch. Kommt es erst im Erwachsenenalter zur Primärinfektion mit EBV kann eine Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber) entstehen (Henle et al., 1968). IM-Patienten haben ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko ein HL zu entwickeln (Munoz et al., 1978). In der westlichen Welt sind ca. 40% aller cHL mit EBV infiziert, während der Anteil in Entwicklungsländern wesentlich höher ist (Jarrett und MacKenzie, 1999). Der Nachweis klonaler EBV-Genome in HRS-Zellen deutet auf ein frühes transformierendes Ereignis in der Pathogenese des cHL hin (Anagnostopoulos et al., 1989; Weiss et al., 1989). In EBV-infizierten HRS-Zellen werden drei EBV-codierte Proteine ausgeprägt: EBNA1, LMP1 und LMP2a (Jarrett und MacKenzie, 1999). EBNA1 ist essentiell für die Replikation des viralen Genoms, könnte aber auch noch weitere Funktionen haben (Rickinson und Kieff, 2001). LMP1 ahmt einen aktivierten CD40-Rezeptor nach, der eine zentrale Rolle in der B-Zelldifferenzierung und dem Überleben von GC-B-Zellen spielt (Kilger et al., 1998). LMP1 führt zur Aktivierung der NF- κ B-, AP-1- und JAK/STAT-Signalwege, die alle in HRS-Zellen konstitutiv aktiv sind (Gires et al., 1997; Gires et al., 1999; Kieser et al., 1997). LMP2a enthält in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITAM-Motif, das auch in den Korezeptoren des BCR vorkommt (Alber et al., 1993). Über das ITAM-Motif rekrutiert LMP2a zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen und kann so einen funktionellen BCR – ein essentielles Überlebenssignal für B-Zellen – nachahmen. Die Fähigkeit von EBV BCR-defiziente humane GC-B-Zellen vor Apoptose zu schützen wurde in drei Studien gezeigt, in denen isolierte tonsilläre GC-B-Zellen *in vitro* mit EBV infiziert wurden, um lymphoblastoide Zelllinien zu etablieren. Viele dieser monoklonalen lymphoblastoiden Zelllinien trugen „verkrüppelte“ BCR (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005). Zudem ergab eine Analyse des V-Gen Mutationsmusters von HRS-Zellen und deren EBV-Status eine erstaunliche Korrelation zwischen „verkrüppelnden“ Mutationen der V-Gene in HRS-Zellen und der Infektion dieser Zellen mit EBV (Bräuninger et al., 2006). EBV spielt somit vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese des cHL.

Da aber nur ca. 40% der cHL EBV-positiv sind, müssen andere Faktoren für die Pathogenese der ca. 60% EBV-negativen cHL verantwortlich sein. Seit langer Zeit wird nach anderen Pathogenen (speziell Viren) gesucht, die eine Rolle in der Pathogenese des HL spielen könnten. Bislang konnten Infektionen der HRS-Zellen mit den Herpesviren HHV6, HHV7, HHV8, Papovaviren oder Adenoviren nicht nachgewiesen werden (Armstrong et al., 1998; Jarrett und MacKenzie, 1999). Hinweise, die eine mögliche Assoziation zwi-

schen Masernviren mit der Pathogenese des cHL nahelegten (Benharroch et al., 2003), wurden widerlegt (Maggio et al., 2007; Wilson et al., 2007). Eine Arbeit, die eine Rolle des Cytomegalovirus in der Pathogenese des cHL in einer Gruppe von chinesischen cHL-Patienten beschrieb (Huang et al., 2002b), konnte nicht verifiziert werden (unpublizierte Daten von Andreas Bräuninger).

Chromosomale Instabilität und chromosomale Aberrationen

Die HRS-Zellen des cHL weisen fast immer chromosomale Anomalien auf (Weber-Matthiesen et al., 1995). Dabei handelt es sich meist um numerische chromosomale Änderungen, die auf eine generelle chromosomale Instabilität der HRS-Zellen hinweisen. CGH-Analysen zeigten das wiederholte Auftreten genomischer Amplifikationen in den Chromosomenabschnitten 2p13-p16, 9p23-p24 und 12q14. Diese Chromosomenabschnitte beinhalten das MDM2-Gen, das JAK2-Gen und das c-REL-Gen (Joos et al., 2000; Joos et al., 2002; Küpper et al., 2001; Martin-Subero et al., 2002). MDM2-Genamplifikationen könnten zu erhöhten MDM2-Proteinmengen führen. MDM2 kann das Tumorsuppressorgen p53 inhibieren. Die höhere Anzahl an Kopien des JAK2-Gen könnte für die konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, die in HRS-Zellen beschrieben wurde. c-REL ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Amplifikation des c-REL-Gens korreliert mit der konstitutiven Aktivität von NF- κ B in HRS-Zellen.

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Analysen der Tumorsuppressorgene p53 und CD95 und des Proto-Onkogens n-Ras zeigten, dass Mutationen in diesen Genen nicht oder nur sehr selten vorkommen (Küppers, 2002). Da HRS-Zellen gegen CD95-vermittelte Apoptose resistent sind, wurden auch andere Mitglieder des CD95-Signalweges auf inaktivierende Mutationen untersucht. Es konnten jedoch keine Mutationen in den Caspase 8-, Caspase 10- oder FADD-Genen in HRS-Zellen nachgewiesen werden (Thomas et al., 2005). Translokationen der Proto-Onkogene BCL2, BCL6, c-MYC und MALT1, die in einigen B-NHL eine Rolle spielen, sind in HRS-Zellen nur sehr selten zu finden (Gravel et al., 1998; Martin-Subero et al., 2004). Somatische Mutationen des NF- κ B-Inhibitors I κ B α kommen in ca. 30% aller untersuchten cHL-Fälle vor (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000). Einige cHL zeigen Mutationen des NF- κ B-Inhibitors I κ B ε (Emmerich et al., 2003). In HRS-Zellen wurden häufig Mutationen des SOCS1-Gens identifiziert (Weniger et al., 2005). SOCS1 ist ein Inhibitor des STAT-Signalweges. Daher wird angenommen, dass inaktivierende Mutationen in SOCS1 als Tumorsuppressor im HL wirken, die zur konstitutiven Aktivität des STAT-Signalweges beitragen.

Konstitutiv aktive Signalwege

In nicht-malignen Zellen ist die Aktivierung der meisten Signalwege streng reguliert. In HRS-Zellen sind allerdings zahlreiche Signalwege aberrant aktiviert. Die experimentelle Inhibition vieler Signalmoleküle zeigte die Wichtigkeit dieser konstitutiven Aktivierung für die Proliferation und das Überleben der HRS-Zellen.

Ein konsistentes Charakteristikum von HRS-Zellen ist die aberrante konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Bargou et al., 1997). NF- κ B besteht aus Homo- und Heterodimeren aus fünf verschiedenen Proteinen (c-Rel, p50, p52, RelB, p65/RelA). In unstimulierten Zellen sind die Dimere von Inhibitoren - den I κ Bs - gebunden, die das NLS (*nuclear localisation signal*) maskieren und dadurch die Translokation von NF- κ B in den Nukleus und dessen Bindung an Zielpromotoren verhindern (Bonizzi und Karin, 2004). Zahlreiche Stimuli, z.B. die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren wie CD40, führen zur Inaktivierung von I κ Bs durch I κ B Kinasen (IKK), die die I κ Bs phosphorylieren. Die I κ Bs werden daraufhin ubiquitiniert und degradiert. Die Aktivierung von NF- κ B führt zu Änderungen in der Expression vieler Proteine, die eine Rolle in der Immunantwort spielen (Zytokine, Chemokine, Adhensionsmoleküle, Enzyme), von apoptotischen Proteinen und in einer negativen Rückkopplungsschleife auch von I κ Bs (Bonizzi und Karin, 2004). Die konstitutive NF- κ B-Aktivität vermittelt sowohl proliferative als auch anti-apoptotische Signale in HRS-Zellen und ist essentiell für ihr Überleben. Verschiedene Mechanismen führen in HRS-Zellen zur NF- κ B Aktivität. Einige Rezeptoren (CD30, CD40, RANK), die mit TRAFs (*TNF receptor-associated factors*) assoziiert sind und den klassischen NF- κ B-Signalweg aktivieren, werden von HRS-Zellen ausgeprägt, und die Liganden für diese Rezeptoren werden von benachbarten Zellen im Infiltrat ausgeprägt (Bräuninger et al., 2006). In EBV-positiven cHL trägt LMP1 zur Aktivierung von NF- κ B bei, indem es einen aktivierten CD40-Rezeptor nachahmt (siehe oben) (Kilger et al., 1998). Genetische Aberrationen wie inaktivierende Mutationen in den NF- κ B-Inhibitoren I κ B α und I κ B ϵ (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Jungnickel et al., 2000) und Amplifikationen des c-Rel-Gens (Joos et al., 2002; Martin-Subero et al., 2002) können ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B führen.

Ein weiterer Signalweg, der in HRS-Zellen konstitutiv aktiv ist, ist der MEK/ERK-Signalweg (Zheng et al., 2003). Die Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges durch eine Vielzahl an Stimuli (verschiedene Rezeptoren u.a. CD30, CD40, RANK, RTK, Integrine, Zytokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) führt zur Phosphorylierung und Aktivierung vieler weiterer Transkriptionsfaktoren. Experimente mit MEK/ERK-Inhibitoren in cHL-Zelllinien deuten auf eine wichtige Rolle in der Regulation von Überleben und Proliferation in HRS-Zellen hin (Zheng et al., 2003).

Analysen des PI3K/AKT-Signalweges in cHL-Zelllinien zeigten eine konstitutive Aktivität dieses Signalweges (Dutton et al., 2005). Eine Folge dieser konstitutiven Aktivität in HRS-Zellen ist die Sezernierung von IL6 und die Expression des EHG-Homeobox-Gens

HLXB9 *in vitro* (Nagel et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges potentiell als Therapiestrategie des HL genutzt werden könnte (Georgakis et al., 2004).

Der AP1-Komplex besteht aus jun und fos Homo- oder Heterodimeren. Der Transkriptionsfaktor AP1 wird durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli aktiviert und spielt eine Rolle in der Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung (Shaulian und Karin, 2002). Sowohl in cHL-Zelllinien als auch in primären HRS-Zellen ist ein AP1-Dimer aus c-Jun und JunB hoch ausgeprägt, was zumindest in den cHL Zelllinien auf die NF- κ B-Aktivität zurückzuführen ist (Mathas et al., 2002). AP1 vermittelt in HRS-Zellen Proliferation (Mathas et al., 2002). Interessanterweise ist auch CD30 eines der AP1-Zielgene. Signaltransduktion über CD30 könnte über eine positive Rückkopplungsschleife zur NF- κ B-Aktivität beitragen und die Expression von JunB weiter verstärken (Watanabe et al., 2003).

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) sind oft an zellulärer Transformation beteiligt (Blumenjensen und Hunter, 2001). RTK sind wichtige Regulatoren intrazellulärer Signalwege. Sie regulieren fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Zellbeweglichkeit und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen. In HRS-Zellen konnte die aberrante Expression verschiedener RTK nachgewiesen werden (Renné et al., 2005b). In vielen cHL Fällen wird mindestens eine der RTK PDGFRA, DDR2, RON, EPHB1, TRKA und TRKB ausgeprägt. Die meisten cHL Fälle zeigen Coexpression für mehrere dieser RTK. Die RTK werden wahrscheinlich autokrin und parakrin über ihre jeweiligen Liganden aktiviert und scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des cHL zu spielen. Weitergehende Analysen zeigten, dass die aberrante Coexpression verschiedener RTK hauptsächlich EBV-negative cHL-Fälle betrifft (Renné et al., 2007). Die aberrante Expression von RTK könnte daher ähnlich wie LMP1 in EBV-positiven cHL-Fällen wirken und das Überleben der HRS-Zellen erklären (siehe oben).

Notch1-Signaltransduktion spielt u.a. eine wichtige Rolle in der B- und T-Zellentwicklung, indem es mit dem Transkriptionsfaktor E2A interferiert (Radtke et al., 2004). Notch1 ist aberrant in cHL-Zelllinien und primären HRS-Zellen ausgeprägt. Der Notch1-Ligand Jagged1 wird sowohl von HRS-Zellen als auch von epitheloiden Zellen im HL-Infiltrat ausgeprägt, so dass davon ausgegangen wird, dass Notch1-Signaltransduktion in HRS-Zellen aktiviert ist (Jundt et al., 2002). Experimentelle Aktivierung von Notch1 in HRS-Zellen führte zu Proliferation und Apoptose-Resistenz (Jundt et al., 2002).

Der JAK/STAT-Signalweg vermittelt die Signale vieler Zytokine, RTK und 7-Transmembran-Rezeptoren (Ihle, 2001). Nach Aktivierung des Rezeptors werden JAK-Kinasen aktiviert und phosphorylieren Mitglieder der Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren. p-STAT formen Dimere und wandern in den Nukleus, wo sie die Transkription verschiedener Zielgene aktivieren (Levy und Darnell, 2002). In HRS-Zellen sind STAT3, STAT5a und STAT6 ausgeprägt und konstitutiv aktiviert (Hinz et al., 2002;

Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2002). Die Aktivierung von STAT6 ist vermutlich über eine autokrine Stimulation des IL13R-Signalweges reguliert, da HRS-Zellen sowohl IL13 als auch den IL13-Rezeptor ausdrücken (Skinnider et al., 2001; Skinnider et al., 2002). Für STAT5a wurde gezeigt, dass sowohl seine Expression als auch seine Aktivierung positiv durch die NF- κ B-Aktivität der HRS-Zellen reguliert ist (Hinz et al., 2002). STAT-Signaltransduktion ist vermutlich wichtig für die Proliferation der HRS-Zellen, denn Inhibition der IL13-Signaltransduktion oder der STAT3-Aktivität in cHL-Zelllinien inhibierte die Proliferation der Zellen (Baus und Pfitzner, 2006; Holtick et al., 2005; Kapp et al., 1999).

Da es sehr komplexe Interaktionen zwischen Signalwegen gibt, ist es sehr wahrscheinlich, dass einige der oben beschriebenen Signalwege die Aktivität anderer Signalwege und Transkriptionsfaktoren modulieren (Bräuninger et al., 2006). So aktivieren RTK den PI3K/AKT-, MEK/ERK- und STAT-Signalweg. Der MEK/ERK-Signalweg aktiviert wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. AP1 und Mitglieder der STAT-Familie. NF- κ B scheint essentiell für die JunB-Expression zu sein und verstärkt die IL13-Transkription. Es scheint, dass zusätzlich zur Interaktion der HRS-Zellen mit ihrem Mikromilieu auch verschiedene autokrine Mechanismen (RTK, IL13 und Notch1/Jagged1) und Rückkopplungsschleifen in Signalwegen (IL13/JAK/STAT6/IL13 und CD30/NF- κ B/AP1/CD30) zur Apoptose-Resistenz und zum Überleben der HRS-Zellen beitragen (Bräuninger et al., 2006).

Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein genetisch programmierter und evolutionär hoch konservierter Prozess zur Eliminierung nicht länger benötigter, defekter oder potentiell für den Organismus gefährlicher Zellen. Apoptose spielt eine entscheidende Rolle im hämatopoetischen System, speziell in lymphoiden Zellen. So werden z.B. B-Zellen ohne funktionellen BCR durch Apoptose eliminiert (Rajewsky, 1996). Mitglieder der Caspase-Familie der Cystein-Proteasen spielen Schlüsselrollen in Signaltransduktionskaskaden, die zu Apoptose führen. Drei Hauptsignalwege führen zur Apoptose-assoziierten Caspase-Aktivierung: der extrinsische Rezeptor-vermittelte, der intrinsische Mitochondrien-vermittelte Signalweg und die Granzym B-vermittelte direkte Aktivierung von Caspase 3, die alle drei Signalwege miteinander verknüpft (Creagh et al., 2003) (Abb.2).

Dem Apoptoseprogramm zu entkommen spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumorzellen. Dies gilt speziell für HRS-Zellen, da sie von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen (siehe Kapitel 1.4.2.1.2). Somit stellt die Entwicklung einer Apoptose-Resistenz ein Schlüsselereignis im Transformationsprozess zur HRS-Zelle dar. Einige der oben beschriebenen aberrant aktivierten Signaltransduktionswege tragen zum Überleben der HRS-Zellen bei, wobei die konstitutive Aktivierung von NF- κ B wohl die wichtigste Rolle spielt.

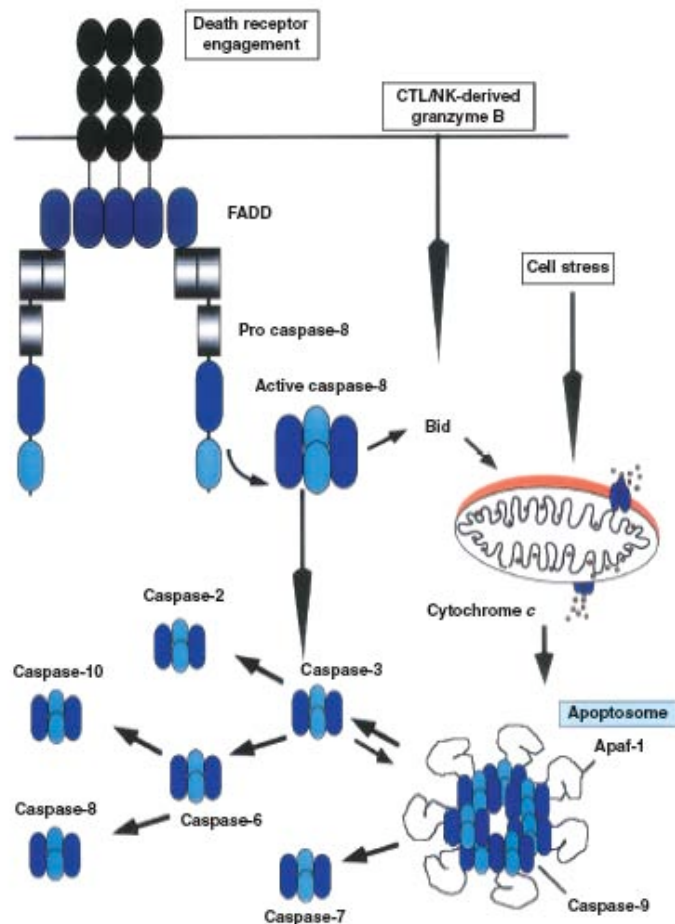


Abbildung 2: Caspase-aktivierende Apoptose-Signalwege

Drei Hauptsignalwege führen zur Apoptose-assoziierten Caspase-Aktivierung - der extrinsische Rezeptor-vermittelte, der intrinsische Mitochondrien-vermittelte Signalweg und die Granzym B-vermittelte direkte Aktivierung von Caspase 3. Alle drei Signalwege sind durch die Aktivierung von Caspase 3 miteinander verknüpft. (CTL, zytotoxische T-Zelle, *cytotoxic T lymphocyte*; NK, natürliche Killerzelle, *natural killer cell*; *death receptor engagement*, Ligandenbindung an sog. Todesrezeptoren; *CTL/NK-derived granzyme B*, von CTL/NK-Zellen stammendes Granzym B; *cell stress*, zellulärer Stress; Apaf-1, *apoptosis protease-activating factor-1*; FADD, *Fas-associated death domain*).

(aus: Creagh et al., 2003, *Immunol Rev*, 193:10-21, Figure 2)

HRS-Zellen exprimieren CD95 (Fas) und andere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie wie TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2, die durch Caspase-Aktivierung Apoptose induzieren. Da HRS-Zellen zusätzlich auch den CD95-Liganden ausdrücken (Metkar et al., 1999; Verbeke et al., 2001), aber *in vitro* gezeigt wurde, dass HRS-Zellen resistent gegen CD95 induzierte Apoptose sind (Re et al., 2000), ist evident, dass der CD95-Apoptose-Signalweg in HRS-Zellen gestört ist. Einige wenige cHL-Fälle weisen Mutation des CD95 Gens auf (Maggio et al., 2003; Müschen et al., 2000b), die in diesen Fällen für die CD95-Apoptose-Resistenz verantwortlich sein könnten. Wichtiger scheint allerdings die Expression von c-FLIP (*c-FLICE inhibitory protein*), einem negativen Regulator der extrinsischen Rezeptor-vermittelten Apoptose, in HRS-Zellen zu sein (Dutton et al., 2004; Maggio et al., 2003; Thomas et al., 2002). Runterregulation von c-FLIP mittels siRNA stellte in HL-Zelllinien die gestörte Signaltransduktion des extrinsischen Rezeptor-vermittelten Apoptose-

Signalweg wieder her (Dutton et al., 2004; Mathas et al., 2004) und zeigte die Wichtigkeit der c-FLIP-Expression und der daraus resultierenden Blockade des extrinsischen Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalweges für die Pathogenese und das Überleben der HRS-Zellen.

Der intrinsische Apoptose-Signalweg ist abhängig von der ausbalancierten Aktivität mitochondrialer pro- und anti-apoptotischer Proteine der BCL2-Familie. Nach Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt eine Kaskade von molekularen Ereignissen über die Formation des Apoptosoms schließlich zur Aktivierung von Caspase 9 und 3 und somit zur DNA-Spaltung (Abb. 2). Ein Defekt in der Aktivierung des pro-apoptotischen BCL2-Familienproteins BAX wurde mit der Mitochondrien-abhängigen Apoptose-Resistenz von HRS-Zellen in Verbindung gebracht (Kashkar et al., 2002), die Relevanz der fehlenden Aktivierung *in vivo* ist hingegen unklar. Ähnlich dem Ungleichgewicht der BCL2-Proteine könnte die deregulierte Expression von Mitgliedern der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie HRS-Zellen Apoptose-Resistenz verleihen. Neben XIAP (Kashkar et al., 2003), cIAP1 und cIAP2 (Zheng et al., 2004) wird auch survivin (Garcia et al., 2003) in variablen Maßen in HRS-Zelllinien und primären HRS-Zellen ausgeprägt.

Verlust der B-Zellidentität

Die Runterregulation einiger B-Zellmarker wie CD20, CD79, Oct-2, Bob-1 und PU.1 in HRS-Zellen wurden durch immunhistochemische Studien gezeigt (Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Torlakovic et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Die fehlende Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Ig-Gen-Transkription regulieren (Oct-2, Bob-1, PU.1), erklärt wohl auch die sehr niedrigen oder nicht vorhandenen Transkriptionslevel von Ig-Genen in HRS-Zellen (Stein et al., 2001). Zudem gibt es Hinweise, dass die Ig-Loci auch durch epigenetische Mechanismen, insbesondere DNA-Methylierung, inaktiviert sind (Ushmorov et al., 2004). Diese epigenetische Inaktivierung mittels Promotormethylierung betrifft nicht nur Ig-Gene, sondern auch B-Zell-spezifische Gene wie PU.1, CD19, CD79b und Bob-1 (Doerr et al., 2005; Ushmorov et al., 2006). Genexpressionsanalysen von HL-Zelllinien und normalen B-Zellen sowie B-NHL zeigten, dass die Runterregulation von B-Zell-spezifischen Genen viel umfassender ist als frühere Studien andeuteten (Schwering et al., 2003a). Die runterregulierten B-Zell-spezifischen Gene umfassen BCR-Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmoleküle. Daraus wurde ersichtlich, dass HRS-Zellen einen globalen Verlust der B-Zellidentität aufweisen (Schwering et al., 2003a). Interessanterweise sind in HRS-Zellen Moleküle, die für die Antigenpräsentation wichtig sind (CD40, CD80, CD86, MHC II), nicht runterreguliert, was impliziert, dass der Erhalt der Fähigkeit zur Antigenpräsentation für HRS-Zellen essentiell ist (Poppema, 1996). Der Grund für die Runterregulation der B-Zell-spezifischen Gene ist unklar. Es wurde spekuliert, dass der Phänotyp der HRS-Zellen eine Plasmazelldifferenzierung reflektiert, da HRS-Zellen oft die Plasmazellmarker MUM-1 und CD138 ausdrä-

gen. Die Expression von PAX5, MHC II und insbesondere die fehlende Ig-Expression in HRS-Zellen sprechen jedoch gegen eine einfache Differenzierung zu Plasmazellen. Die aberrante Expression von Notch1, dem Masterregulator der T-Zellentwicklung, könnte eine Rolle bei der Unterdrückung des B-Zellphänotypes in HRS-Zellen spielen. Unabhängig vom Mechanismus, der den globalen Verlust der B-Zellidentität verursacht, könnte diese dramatische phänotypische Veränderung für die HRS-Zelle von Vorteil sein und somit einen Selektionsfaktor in der Pathogenese darstellen. Vor dem Hintergrund, dass HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen, die aufgrund von unvorteilhaften V-Gen-Mutationen keinen hochaffinen BCR ausprägen können, könnte der Verlust der B-Zellidentität (und der Signaltransduktions-Maschinerie, die nach Verlust eines hochaffinen BCR Apoptose induziert) in der Tat eine Strategie der HRS-Zellen sein, um der stringenten Selektion für einen hochaffinen BCR zu entkommen.

1.4.2.2 Das noduläre lymphozyten-prädominante HL (NLP HL)

Die normale Lymphknotenarchitektur ist im NLP HL üblicherweise erhalten. Im NLP HL dominiert ein Infiltrat aus kleinen Lymphozyten. L&H-Zellen ähneln GC-B-Zellen in ihrem follikulären Wachstumsmuster und ihrer Assoziation mit follikulären dendritischen Zellen (FDC) und CD57⁺ T-Helferzellen (Hansmann et al., 1999). L&H-Zellen sind wie HRS-Zellen größer als Lymphozyten. Sie ähneln Zentroblasten, sind aber größer und haben gelappte Zellkerne mit kleinen bis mittelgroßen basophilen Nukleoli. Die Zellkerne der L&H-Zellen sind meist etwas kleiner als die der HRS-Zellen. Das Zytoplasma der L&H-Zellen ist relativ ausgedehnt und nur schwach basophil (Hansmann et al., 1999). NLP HL tritt in allen Altersgruppen auf, jedoch mit einer Häufung in der vierten Lebensdekade (Poppema et al., 1979).

1.4.2.2.1 Immunhistochemische Analysen des NLP HL

Im Gegensatz zu den großen Varianzen im Immunphänotyp des cHL sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen der L&H-Zellen des NLP HL relativ konsistent. L&H-Zellen prägen das Leukozytenantigen CD45 und die meisten B-Zellmarker, wie CD20, CD79a, BCL6, J-Kette, HGAL, centerin und AID, in immunhistochemisch nachweisbarem Maß aus (Falini et al., 1996; Greiner et al., 2005; Hansmann et al., 1999; Montes-Moreno et al., 2008; Natkunam et al., 2005). Allerdings haben auch L&H-Zellen die Expression einiger B-Zellmarker, nämlich CD19, CD10, PAG, LYN, LCK, LSP1, CD22, CD37, CD79B und Ets-1, verloren (Dogan et al., 2000; Marafioti et al., 2003; Marafioti et al., 2004a; Marafioti et al., 2004b; Masir et al., 2006; Paterson et al., 2006; Tedoldi et al., 2006b; Tedoldi et al., 2007; Uherova et al., 2003). Die immunhistochemische Detektion von Immunglobulinen in L&H-Zellen ist variabel (Hansmann et al., 1999). In 25-50% der NLP HL-Fälle prägen die L&H-Zellen EMA (*epithelial membrane antigen*) aus (Hansmann et al., 1999). Für CD30 und CD15, den diagnostischen Markern der HRS-Zellen, sind

L&H-Zellen negativ. Ebenso sind die L&H-Zellen negativ für BCL2 und T-Zellmarker, wie CD3 und CD45RO, oder T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren, wie GATA3, c-MAF und GATA2 (Atayar et al., 2005; Hansmann et al., 1999). Im Gegensatz zu HRS-Zellen sind L&H-Zellen nahezu immer negativ für EBV (Hansmann et al., 1999). Die interfollikulären Regionen sind von CD3⁺ T-Lymphozyten dominiert. Die L&H-Zellen rosettierenden T-Zellen sind CD57⁺, die Netzwerke von FDC sind CD21⁺ (Hansmann et al., 1999).

1.4.2.2.2 Ursprung und Klonalität der L&H-Zellen

Wie auch im cHL erschwerte die Seltenheit der L&H-Zellen im Tumorgewebe zunächst die biologischen Analysen. Die Expression der meisten B-Zellmarker in L&H-Zellen des NLPHL deutete allerdings schon auf deren Abstammung von GC-B-Zellen hin. Dies wurde auf molekularer Ebene durch den Nachweis klonaler Ig-Genumlagerungen in den L&H-Zellen bestätigt (Braeuninger et al., 1997; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997; Ohno et al., 1997). Alle bislang analysierten Fälle wiesen somatisch mutierte V-Gene auf (Braeuninger et al., 1997; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997). In vielen dieser Fälle konnte intraklonale V-Gen-Diversität nachgewiesen werden, was auf fortschreitende somatische Hypermutation während der klonalen Expansion der L&H-Zellen hindeutet (Braeuninger et al., 1997; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997). Da aktive Hypermutation ein Charakteristikum von GC-B-Zellen ist (Küppers et al., 1993), deutet dies auf einen GC-B-Zellursprung der L&H-Zellen hin. Im Gegensatz zum cHL wurde kein NLPHL Fall mit „verkrüppelnden“ Mutationen gefunden. Daher scheinen L&H-Zellen transformierte, selektierte, mutierende GC-B-Zellen zu repräsentieren.

1.4.2.2.3 Pathogenese des NLPHL

Chromosomale Instabilität und chromosomale Aberrationen

Es existieren nur wenige zytogenetische Daten zum NLPHL. Ploidie-Analysen an fünf NLPHL zeigten, dass drei dieser Fälle eine aneuploide Population aufwiesen. Tetraploidie, wie sie oft im cHL gefunden wurde, konnte nicht identifiziert werden (Haber et al., 1992). Zudem ist ein hyperploider NLPHL publiziert, der verschiedene strukturelle Aberrationen aufweist, u.a. eine 6q-Deletion (Hansmann et al., 1986). Eine CGH-Analyse an 19 NLPHL zeigte das Vorkommen von rekurrenten, aber unspezifischen chromosomalen Abnormalitäten (Franke et al., 2001).

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Etwa 50% der NLPHL tragen Umlagerungen des BCL6-Onkogens (Renné et al., 2005a; Wlodarska et al., 2003). Translokationspartner für diese BCL6-Onkogen-Umlagerungen sind sowohl Ig-Loci als auch non-Ig-Loci (Renné et al., 2005a; Wlodarska et al., 2004). Die vermutlich von einem NLPHL-Patienten abstammende HL-Zelllinie DEV weist eine

Umlagerung des BCL6 Gens mit einem Strangbruch in der BCL6 alternativen Bruchpunkt-region (ABR) auf (Atayar et al., 2006). In 12 primären NLP HL konnte das Auftreten von BCL6-ABR-Umlagerungen jedoch nicht bestätigt werden (Atayar et al., 2006).

BCL2-Translokationen wurden nur in wenigen NLP HL nachgewiesen (Algara et al., 1991; Lorenzen et al., 1992; Said et al., 1991). Es ist nicht klar, ob die BCL2-Umlagerung in den L&H-Zellen oder *Bystander*-B-Zellen vorhanden ist. Da L&H-Zellen generell kein BCL2-Protein ausprägen, spielen BCL2-Translokationen vermutlich keine Rolle in der Pathogenese des NLP HL.

Verschiedene Proto-Onkogene (PAX5, PIM1, RhoH/TTF, c-Myc) sind Ziel aberranter somatischer Hypermutation in L&H-Zellen, wodurch die Funktion dieser Gene verändert sein könnte und dies somit zur Pathogenese des NLP HL beitragen könnten (Liso et al., 2006). Mutationen des SOCS1-Gens (Inhibitor des STAT-Signalweges) wurden in L&H-Zellen in 6/12 primären NLP HL und der Zelllinie DEV gefunden (Mottok et al., 2007). Das Proto-Onkogen BIC (B-cell integration cluster)/pre-miR155 und die reife miR155, die als Onko-miR betrachtet werden (Tam und Dahlberg, 2006), sind sowohl in cHL also auch im NLP HL stark ausgeprägt (Kluiver et al., 2005; van den Berg et al., 2003). Der Tumorsuppressor p53 wird in L&H-Zellen nicht ausgeprägt (Lauritzen et al., 1993).

Apoptose

Caspase 3 wird in L&H-Zellen nicht ausgeprägt (Izban et al., 1999). L&H-Zellen scheinen daher resistent gegenüber Apoptose-Stimuli (z.B. CD95/FAS) zu sein, die von Signaltransduktion über Caspase 3 abhängig sind (vgl. Kapitel 1.4.2.1.3). Zudem konnte die Ausprägung von c-FLIP, einem negativen Regulator der extrinsischen Rezeptorvermittelten Apoptose, in L&H-Zellen nachgewiesen werden (Uherova et al., 2004).

1.5 Affymetrix Microarray-Technologie

Die Microarray-Technologie ermöglicht die simultane, quantitative Messung der Expression tausender Gene. Zur Herstellung der GeneChip® Microarrays benutzt die Firma Affymetrix ein Verfahren, das auf einer Kombination aus Photolithographie und kombinatorischer chemischer Synthese beruht. Dabei werden in einem mehrstufigen *in situ* Prozess 25-mer lange Oligonukleotide (*probes*) auf eine Glasoberfläche (*wafer*) synthetisiert. Jedes *Probe pair* besteht aus einer *Probe*, die komplementär zur zugehörigen Referenzsequenz ist (*Perfectmatch Probe*, *PM*) und einer *Probe*, die sich in einem Nukleotid von der Referenzsequenz unterscheidet (*Mismatch Probe*, *MM*) (Abb. 3). Elf *Probe pairs* bilden ein *Probe set*, das eine bestimmte Sequenz im menschlichen Genom interrogiert. Dabei wurden die *Probes* so ausgewählt, dass sie nahe dem 3'-Ende des Transkriptes liegen, um Probleme, die bei der Verwendung partiell degradierter oder durch Amplifikation verkürzter RNA entstehen können, zu verringern. In dieser Analyse wurden GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays der Firma Affymetrix verwendet. Dieser Array enthält Oli-

gonukleotidsonden für 54.675 *Probe sets*, die ca. 47.000 humane Transkripte repräsentieren.

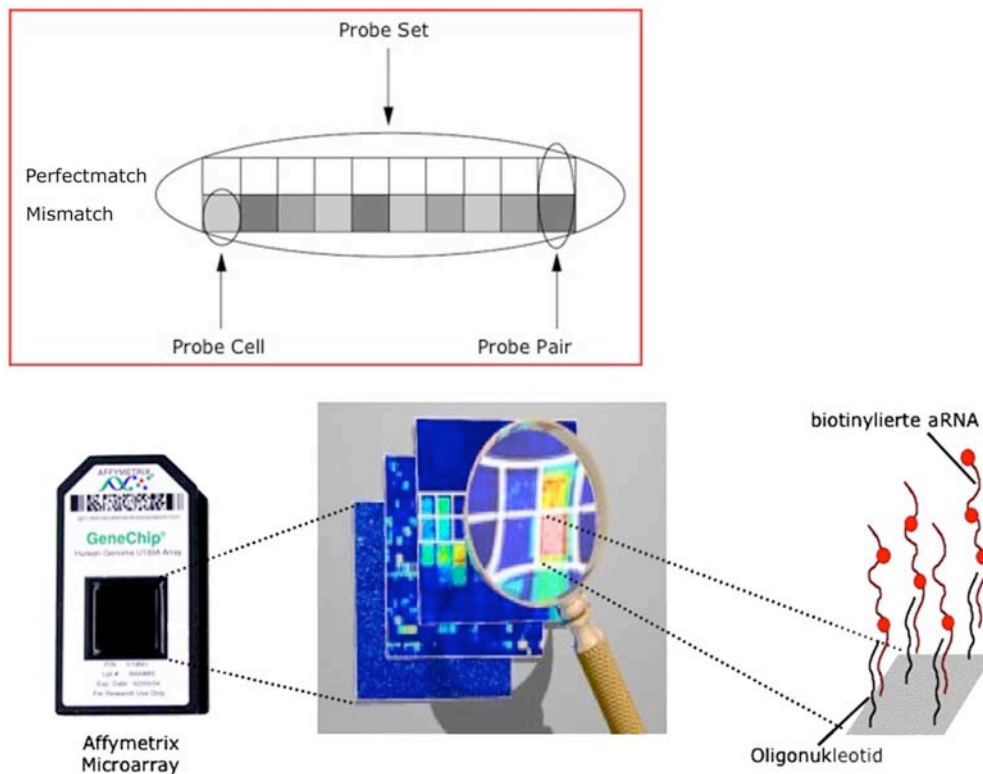


Abbildung 3: Affymetrix Microarray Design

Jedes *Probe pair* besteht aus einer *Probe*, die komplementär zur zugehörigen Referenzsequenz ist (*Perfect Match Probe*, PM) und einer *Probe*, die sich in einem Nukleotid von der Referenzsequenz unterscheidet (*Mismatch Probe*, MM). Elf *Probe pairs* bilden ein *Probe set*, das eine bestimmte Sequenz im menschlichen Genom interrogiert.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifizierung der zellulären Abstammung ermöglicht den Vergleich der HRS bzw. L&H-Zellen mit ihren nicht-malignen Ursprungszellen, den GC-B-Zellen, auf Ebene der genomweiten Genexpressionsanalyse. Durch die Analyse differentieller Genexpression von cHL-Zelllinien wurden bereits wichtige Einsichten in die Biologie der HRS-Zellen – wie z.B. der Verlust der B-Zellidentität der HRS-Zellen – gewonnen. Dennoch gibt es wichtige Unterschiede zwischen HL-Zelllinien und primären HRS bzw. L&H-Zellen. Alle HL-Zelllinien wurden von Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung etabliert. Die Patienten hatten meist schon mehrere Chemotherapien erhalten und die Zelllinien wurden nicht aus Lymphknoten sondern aus Ausschwemmungen der HRS-Zellen ins Blut oder Knochenmark etabliert, die offensichtlich die Abhängigkeit von einem zentralen Aspekt der Biologie des HL, dem zellulären Mikromilieu des Lymphknoten, verloren hatten. Vor diesen Hintergrund ist es sehr wahrscheinlich, dass genomweite Genexpressionsanalysen an primären HRS- bzw. L&H-Zellen weitere wichtige Eigenschaften des HL zeigen werden.

Zudem gibt es nur eine HL-Zelllinie, die von L&H-Zellen abstammen soll. Die Aussage über deren Abstammung beruht allerdings nur auf morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen und ist nicht durch genetische Analysen bestätigt worden.

Bislang gibt es keine genomweiten Genexpressionsanalysen an primären HRS- oder L&H-Zellen. Da diese Zellen nur vereinzelt im Gewebe vorliegen und herkömmliche Isolationsmethoden wie Fluoreszenz-aktivierte oder magnetische Zellseparation nicht für primäre HRS- bzw. L&H-Zellen anwendbar sind, müssen die Genexpressionsanalysen mit wenigen hundert mikrodisezierten Zellen durchgeführt werden. Dazu muss in erster Linie ein geeignetes (reproduzierbares und verlässliches) Protokoll zur Amplifizierung der RNA dieser wenigen Zellen etabliert werden, welches sich für Affymetrix Genechip-Analysen eignet. Neben den Genexpressionsprofilen primärer HRS- und L&H-Zellen sollen auch Genexpressionsprofile verschiedener Subtypen normaler B-Zellen (naive und Gedächtnis-B-Zellen, Zentrozyten, Zentroblasten und Plasmazellen) und der Tumorzellen anderer B-Non-Hodgkin-Lymphome (Follikuläre Lymphome, diffus-großzellige B-Zell-Lymphome, T-zell-reiche B-Zell-Lymphome und Burkitt-Lymphome) als Vergleichspopulationen generiert werden.

Durch die Analyse differentieller Genexpression der L&H-Zellen im Vergleich zu ihren nicht-malignen Ursprungszellen, den GC-B-Zellen, sollen Gene identifiziert werden, deren aberrante Expression eine wichtige Rolle in der Pathogenese des NLPHL spielen, sowie neue diagnostische, therapeutische und möglicherweise auch prognostische Marker gefunden werden. Zudem sollen durch den Vergleich der Genexpressionsprofile der L&H-Zellen mit den Genexpressionsprofilen der verschiedenen normalen und malignen B-Zellen auch L&H-spezifische Gene identifiziert werden.

Ein direkter Vergleich der differentiellen Genexpression beider HL Entitäten, cHL und NLPHL, ist sehr interessant, da sich beide Lymphome morphologisch und genetisch in einigen Merkmalen unterscheiden. Die Analyse der differentiellen Genexpression beider Entitäten soll Einsicht in die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der pathogenen Mechanismen geben.

Zur Überprüfung der Validität der in dieser Arbeit generierten Genexpressionsprofile soll die aberrante Expression einiger interessanter Gene immunhistochemisch analysiert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressionsanalyse weniger Zellen

2.1.1 Zelllinien

Die HL-Zelllinien L428 und KMH2 stammen von Patienten mit cHL ab und haben einen B-Zell-Ursprung (Drexler, 1993). Die T-Zelllinie Jurkat stammt von einem Patienten ab, der an einer T-Zell-Leukämie erkrankt war (Schneider et al., 1977).

2.1.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in RPMI-1640 Glutamax-1 Zellkulturmedium (Invitrogen) versetzt mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.1.1.2 Sortierung der Zelllinien

Alle Schritte fanden bei 0-4°C statt, um Änderungen im Genexpressionsmuster zu verhindern. Die Zellen der Zelllinien L428, KMH2 und Jurkat wurden bei 100 x g zentrifugiert, in PBS-BSA gewaschen und auf eine Zelldichte von 2x10⁶ eingestellt. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Cell-Tric) mit einer Maschengröße von 45 µm gesiebt, um Zellaggregate abzutrennen. Um tote Zellen während der Sortierung mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellseparation (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) zu erkennen, wurden die Zellen mit 5 µg/ml Propidiumiodid gefärbt.

Zur Etablierung der cDNA-Synthese und RNA-Isolation wurden je 10 Zellen der Zelllinien KMH2 und Jurkat mittels FACS-DIVA (Becton Dickinson) in RNase-freie Reaktionsgefäße (Eppendorf) mit 20 µl PCR-Puffer (Roche) mit 0,5% Nonidet® P40 bzw. 20 µl Lyse-Puffer der unter 2.1.3 genannten RNA-Isolations Kits (Qiagen, Stratagene, Gentra) sortiert, kurz anzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zur Etablierung der RNA-Amplifikation wurden je 500 Zellen der HL-Zelllinie L428 in RNase-freie Reaktionsgefäße (Eppendorf) mit 50 µl Purescript Lysis Puffer (Gentra) sortiert, kurz anzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.1.2 Etablierung verschiedener genspezifischer RT-PCRs

Zur Etablierung verschiedener genspezifischer RT-PCRs wurde die Gesamt-RNA aus 10⁷ Zellen der Zelllinien Jurkat und KMH2 isoliert (TRIZOL® Reagent, Invitrogen). Die Jurkat-RNA diente als Positivkontrolle für die Expression von CD52, die KMH2-RNA für die Expression von PRAME, IPL, RAB13, EAR-3, FER, RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT}. Die jeweilige RNA wurde mit 0,6 µM eines genspezifischen Oligonukleotids (RhoC rev 5'- CGC TTG TTC TTG CGG ACC TGG A-3', ATBF1 rev 5'-GGT GTC CGT TCC TCA ACT GGT C-3', p21^{SNFT}

rev2 5'-TCC CGA TCT CTC TCC GCA GCA TGG-3', CD52 rev 5'-CTG GTG ATG TCT GGC ATC AAC C-3', PRAMErev_a 5'-AGG GCA AGG AGC TGA TCA TCC G-3'; IPL UTRrev 5'-CTA GCC TCG GTC CGA CTC GTC C-3'; RAB13rev 5'-CTC ATC CGT GAT GTC GTA TAC TAG G-3'; EAR3rev 5'-TGG ATT GGG CTG GGT TGG AGG C-3'; FERrev 5'-CGG ACA AAC CCC TAA GCT GAA GG-3') für 10 min. bei 70°C denaturiert. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des 1st Stand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche) generiert. Es wurde eine 2 Runden PCR etabliert, die mit Ausnahme von ATBF1 intronüberspannend war. Die PCR wurde mit dem ExpandTM High Fidelity PCR Systems (Roche) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 µM Desoxynukleotide, 0,125 µM Primer. Das Cyclex-Programm war: 15 min. bei 95°C, 60 sek. bei der Hybridisierungstemperatur (genspezifisch, siehe Tabelle 1), 60 sek. bei 72°C und eine genspezifische Anzahl von Zyklen (siehe Tabelle 1) von 30 sek. bei 95°C, 30 sek. bei Hybridisierungstemperatur und 45 sek. bei 72°C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 72°C.

Tabelle 1: PCR Bedingungen der RT-PCRs

Gen	1. Runde			2. Runde			Produktlänge (bp)
	MgCl ₂ (mM)	Zyklenzahl	Hybr. Temp. (°C)	MgCl ₂ (mM)	Zyklenzahl	Hybr. Temp. (°C)	
RhoC	3	29	65	2	29	65	105
ATBF1	3	24	60	2	24	65	115
FER	2	19	60	2,5	29	60	114
PRAME	2	39	60	2	29	60	352
IPL	1,5	39	67	-	-	-	98
RAB13	1,5	19	61	2	29	61	104
p21 ^{SNFT}	2	29	65	1,5	29	65	131
EAR3	2	19	60	2	29	60	151
CD52	2	39	65	-	-	-	327

MgCl₂ bezeichnet die Endkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz. Hybr. Temp bezeichnet die Hybridisierungstemperatur, die im Cyclex-Programm verwendet wurde. Die aufgeführten Produktlängen beziehen sich auf das RT-PCR Produkt der 2.Runde, außer für IPL und CD52, zu denen keine 2. Runde etabliert wurde.

Die erste Runde der PCR wurde mit dem strangabwärts gelegenen Oligonukleotid (welches schon für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde, siehe oben) und dem korrespondierenden strangaufwärts gelegenen Oligonukleotid durchgeführt (RhoC for_{1sc} 5'-ACC CGG ACA CTG ATG TCA TCC TC-3', ATBF1 for_{1sc} 5'-CCT CCA GGA AGT CTT GGC CGC-3', p21^{SNFT} for_{sc} 5'-AGC TCC CGG CAT GTC GCA AGG-3', PRAMEfor 5'-GCA GTA TAT CGC CCA GTT CAC C-3'; IPLfor 5'-GAG CCC TCG GAG CCC TCC AGG-3'; RAB13for_a 5'- GTC TGA TCA TTC GCT TTG CAG AGG-3'; EAR3for_a 5'- CCA ATT CAC CTG CGA GGG CTG C-3'; FERfor_a 5'-GCT GCA AGA AAC TGC CTG GTA GG-3'). In der zweiten Runde der PCR wurden 1 µl des Produkts der ersten Runde eingesetzt und ein intern gelegener 5'-Primer (RhoC for_{2sc} 5'-CAG TGC CTT TGG CTA CCT TGA-3', ATBF1 for_{2sc} 5'-GGA GTC TGA CAC GGA TCT CAG C-3', p21^{SNFT} rev_{1sc} 5'-TTC GGA CCT TCC TGT CAT CAT CC-3', PRAMErev_i 5'-

GGT TTC CAA GGG GTT CAT CAC G-3', RAB13for_i 5'- CTA CAA GTC TGG GAC ACG GCT GG-3', EAR3for_i 5'-CTT ACA CAT GCC GTG CCA ACA GG -3', FERfor_i 5'- CAT TAA ATG GAC AGC ACC GGA AGC-3') zusammen mit dem entsprechenden Primer der ersten Runde verwendet (Tabelle 0.1). Diese zweite Runde diente vor allem dazu, unspezifische Produkte der ersten Runde durch die Verwendung intern gelegener Primer zu reduzieren und wurde nicht benötigt, um das Produkt nachweisen zu können.

Um die RT-PCR für kleine Zellmengen zu optimieren, wurde die RNA aus 10 FACS-sortierten Jurkat bzw. KMH2 Zellen sowie 0,6 µM des jeweiligen genspezifischen Oligonukleotids (siehe oben) für 10 min. bei 70°C denaturiert. Das T4-Gen-32-Protein (T4 gp32) (Ambion) wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/Probe während dieser Denaturierung zugegeben. Die cDNA-Synthese wurde mit dem OneStep RT-PCR-Kit (Qiagen) unter Zugabe von 10 U eines RNase-Inhibitors (Roche) durchgeführt. Das Enzym (2 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzymmix) wurde nach einem Hitzeschritt bei 50°C für 2 min. zugegeben.

2.1.3 Etablierung einer RNA-Isolationsmethode ausgehend von geringen Zellmengen

2.1.3.1 Nonidet® P40 (NP40) (AppliChem)

Nonidet® P40 (NP40) ist ein nichtionisches Tensid, das als Detergenz zur Lyse von Zellen benutzt werden kann. Die zu analysierenden Zellen wurden in 0,5% NP40 in PCR Puffer des Expand™ High Fidelity PCR Systems (Roche) mittels FACS sortiert und bei Raumtemperatur lysiert.

2.1.3.2 RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

Der RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nutzt die selektive Bindung von Nukleinsäuren an Silica-Gel-Membranen zur Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA für ein Säulensystem. Die Zellen werden durch den Einsatz von GCN (Guanidin-Isothiocyanat) im Lysepuffer lysiert. GCN verhindert zudem die Degradation von RNA durch RNasen. Der Kit wurde nach Angaben des Herstellers benutzt, um Gesamt-RNA aus FACS-sortierten Zellen zu isolieren. Dieser Kit ist geeignet um bis zu 100 µg Gesamt-RNA zu isolieren. Die minimale Menge an Gesamt-RNA, die isoliert werden kann, war leider nicht angegeben. Der Kit ist allerdings laut Herstellerangaben entwickelt worden, um Gesamt-RNA von kleinen Mengen an Startmaterial zu isolieren.

2.1.3.3 StrataPrep® Total RNA Microprep Kit (Stratagene)

Der StrataPrep® Total RNA Microprep Kit (Stratagene) erlaubt nach Herstellerangaben die Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus kleinen Zellmengen. Auch in dieser Methode wird ein Lysepuffer benutzt, der GCN zur Lyse der Zellen und zum Schutz der

RNA vor RNasen enthält. Nach der Lyse der Zellen wird die Gesamt-RNA über Säulen, die Silica-Gel-Membranen enthalten, gebunden. Ein DNase-Verdau wird auf den Säulen durchgeführt und die Gesamt-RNA anschließend aufgereinigt. Dieser Kit wurde nach Angaben des Herstellers angewandt.

2.1.3.4 Purescript® RNA Isolation Kit (Gentra)

Das Prinzip des Purescript® RNA Isolation Kits basiert auf Salzpräzipitation und dem Einsatz von RNase-Inhibitoren. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus FACS-sortierten oder lasermikrodissektierten Zellen wurde das Purescript RNA Extraction Protokoll (Gentra) modifiziert. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 4°C, um die RNA zu schützen und die RNA-Pellets fester zu machen. Die Mengen aller Reagenzien wurden auf ein Zehntel der Mengen, die im Standardprotokoll angegeben sind, reduziert. Pro Reaktion wurden 80 µg Glykogen (Roche) als Fällhilfe eingesetzt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser (Eppendorf) durch Inkubation für 30 min. bei 4°C resuspendiert. Zur Verbesserung der RNA-Resuspendierung wurden die Proben weitere 10 min. bei 70°C inkubiert und dann für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren.

2.1.4 Etablierung einer cDNA-Synthese ausgehend von geringen RNA-Mengen

Zur Etablierung der beiden unter 2.1.4.1 und 2.1.4.2 beschriebenen Kits zur cDNA-Synthese wurde Gesamt-RNA der Zelllinien Jurkat und KMH2 eingesetzt (40 ng, Verdünnungen entsprechen 200-0,2 Zelläquivalenten) und auf die Expression von CD52 bzw. TARC analysiert. Um die Anwendbarkeit der Methode für lasermikrodissektierte Zellen zu überprüfen, wurden Zytospins von sortierten KMH2-Zellen und T-Zellen, die unter Verwendung des Pan T-Zell Kit (Milteniy Biotech) mittels magnetischer Zellseparation (*magnetic-activated cell sorting*, MACS; Milteniy Biotech) aus humanem Blut isoliert wurden, angefertigt. Die Zellen wurden anschließend auf die Expression von CD52 bzw. IPL analysiert.

2.1.4.1 Titan™ One Tube RT-PCR Kit (Roche)

Der Titan™ One Tube RT-PCR Kit (Roche) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Kit wurde „für den empfindlichen, schnellen und reproduzierbaren Nachweis von RNA-Molekülen mit hoher Reproduktionstreue entwickelt“ (Herstellerangabe). Dieser Kit verwendet ein Ein-Schritt-Protokoll, bei dem die Reverse Transkriptase AMV (*avian myeloblastosis virus*) für die Erststrang-Synthese eingesetzt wird. Durch den Einsatz von AMV kann die Reverse Transkription bei höheren Temperaturen durchgeführt werden (50°C statt 42°C), was die Effizienz der Reaktion erhöht, da RNA-Sekundärstrukturen besser gelöst werden können. Für den PCR-Teil der Reaktion wird der Expand™ High Fidelity Enzym-Mix, der aus Taq DNA-Polymerase und Pwo DNA-Polymerase (die Pwo DNA-Polymerase reduziert aufgrund ihrer Korrekturlese-Eigenschaft die Fehlerrate in der PCR)

besteht, verwendet. Der RT-PCR Puffer wurde speziell optimiert und enthält DMSO, was die Stabilität von RNA-Haarnadelstrukturen, die in der RT-PCR hindern, reduziert.

2.1.4.2 OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)

Der OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Kit enthält optimierte Komponenten, die es erlauben, die Reverse Transkription und die PCR in einen Reaktionsgefäß durchzuführen (Ein-Schritt Protokoll). Dieser Kit ist für die Verwendung mit genspezifischen Primern in einer Endkonzentration von 0,6 μM vorgesehen. Im Enzym-Mix sind Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptasen enthalten. Beide Enzyme besitzen eine deutlich höhere Affinität zu RNA als andere Reverse Transkriptasen (z.B. AMV oder MMLV, *Moloney murine leukemia virus*), wodurch die Transkription von RNA-Bereichen mit Sekundärstrukturen erleichtert wird. Omniscript™ Reverse Transkriptase wurde speziell für die Reverse Transkription von RNA-Mengen größer als 50 ng entwickelt, während Sensiscript™ Reverse Transkriptase für die Verwendung mit sehr kleinen RNA-Mengen (<50 ng) optimiert ist. Diese Enzymkombination ermöglicht eine effiziente und sensitive Reverse Transkription beliebiger RNA-Mengen im Bereich von 1 pg bis zu 2 μg . Nach der Reversen Transkription werden die Proben für 15 min. bei 95°C erhitzt, um die HotStarTaq™ DNA-Polymerase zu aktivieren (während der Reversen Transkription ist sie vollkommen inaktiv und beeinträchtigt deshalb diese Reaktion nicht) und gleichzeitig die Reversen Transkriptasen zu inaktivieren. Diese Methode verhindert die Verlängerung unspezifisch gebundener Primer sowie die Bindung von Primer-Dimeren während des ersten Zyklus, so dass eine hochspezifische PCR gewährleistet ist. Obwohl alle Enzyme im Reaktionsgemisch vorhanden sind, wird durch die Verwendung von HotStarTaq™ DNA-Polymerase eine zeitliche Trennung von Reverser Transkription und PCR erreicht, so dass beide Prozesse aufeinander folgend in einem einzigen Reaktionsgefäß ablaufen können. Der optimierte RT-PCR Puffer ermöglicht die Durchführung der Reversen Transkription bei 50°C, was die Effizienz der Reaktion erhöht, da RNA-Sekundärstrukturen besser gelöst werden können. Die im Kit enthaltene „Q-Solution“ ist ein Additiv, das die Amplifikation schwieriger *Templates* durch die Veränderung des Schmelzverhaltens der Nukleinsäuren erleichtert.

2.1.5 Etablierung eines RNA-Amplifikationsprotokolls zur Verwendung von Affymetrix Microarrays

2.1.5.1 Modifizierter SuperSMART® PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech)

Die Erststrang-Synthese wird im SuperSMART® PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) normalerweise mit dem SMART-Oligonukleotid, das eine Oligo-G-Sequenz am 3'-Ende enthält, und dem CDS-Primer initiiert. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde der CDS-Primer durch einen Oligo(dT)T7-Primer ersetzt, der die T7 Promotor-Sequenz

enthält, um nach der PCR-basierten Amplifikation die Umschreibung in aRNA und deren Markierung mittels des BioArray™ High Yield™ Transcription Labeling Kit (ENZO Life Science) zu ermöglichen (Abb. 4).

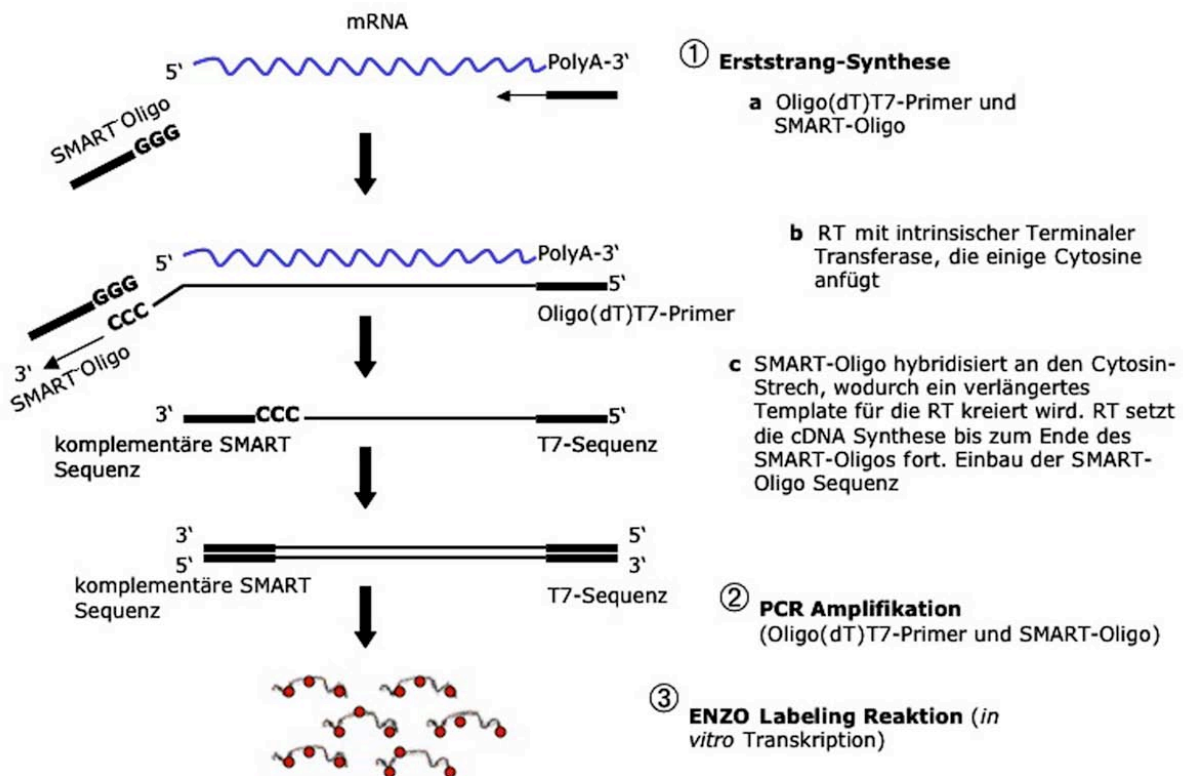


Abbildung 4: Schematische Übersicht der einzelnen Schritte des modifizierten SuperSMART® PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) und anschließender ENZO-Labeling-Reaktion

Wenn die Reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, werden durch die intrinsische Terminale Transferase-Aktivität des Enzyms zusätzliche Nukleotide (Hauptsächlich Cytosine) an das 3'-Ende der cDNA angefügt. Das SMART-Oligo hybridisiert an den Cytosine-Stretch, wodurch ein verlängertes Template für die Reverse Transkriptase generiert wird. Die Reverse Transkriptase setzt die cDNA-Synthese bis zum Ende des SMART-Oligos fort, was zum Einbau der SMART-Oligo-Sequenz in die cDNA führt. Die Amplifikation wird anschließend unter Verwendung eines Oligo(dT)T7-Primers und des SMART-Oligos durchgeführt. Die Verwendung des Oligo(dT)T7-Primers in der PCR ist notwendig, um - wie oben erwähnt - die Umschreibung in aRNA und deren Markierung mittels des BioArray™ High Yield™ Transcription Labeling Kit (ENZO Life Science) zu ermöglichen. Mit der SuperSMART Technologie sollte theoretisch keine Verkürzung der Transkripte auftreten.

2.1.5.2 RiboAmp™ Amplification Kit (Arcturus)

Der RiboAmp™ Amplification Kit (Arcturus) wurde mit einigen Modifikationen nach Angaben des Herstellers benutzt. Der Kit verwendet in der Erststrang-Synthese einen Oligo(dT)T7-Primer, durch den die T7 Promotor-Sequenz in die cDNA einbaut wird (Abb. 5).

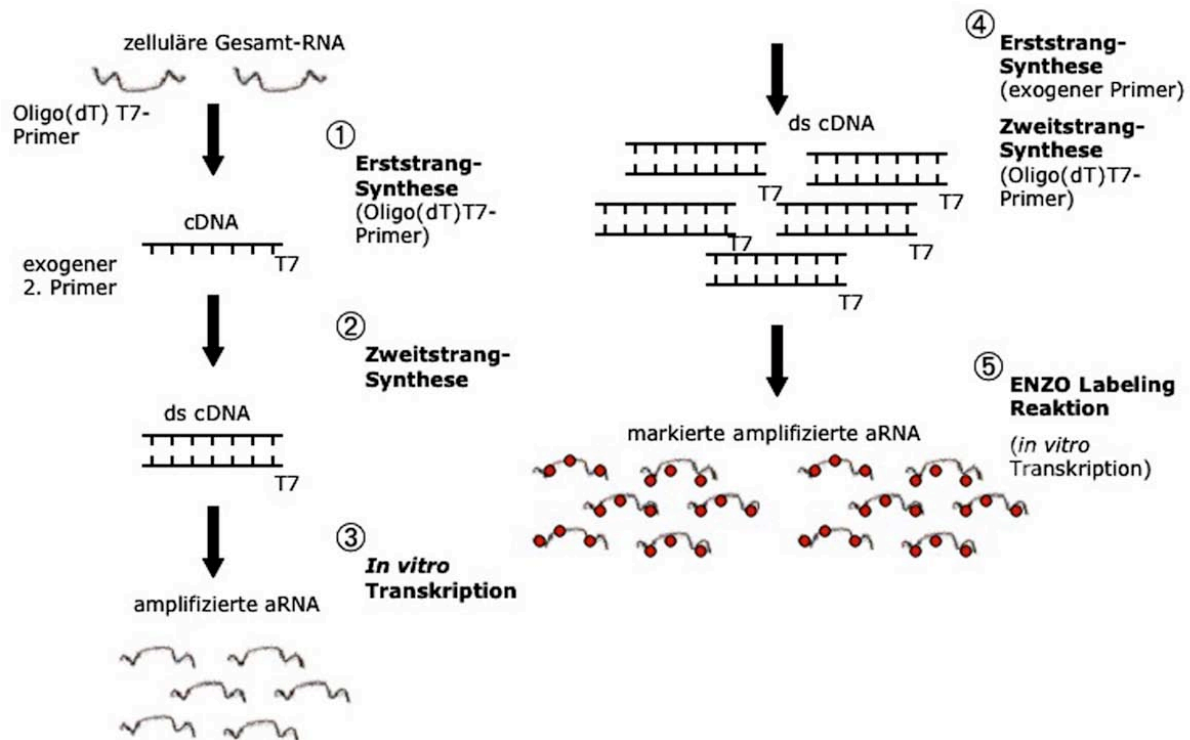


Abbildung 5: Schematische Übersicht der einzelnen Schritte des RiboAmp™ Amplification Kit (Arcturus) und anschließender ENZO-Labeling-Reaktion

Da die Startmenge an Gesamt-RNA im Fall von ca. 1000 lasermikrodissektierten Zellen unter 100 ng liegt, wurden, anders als im Herstellerprotokoll vorgesehen, 100 ng/μl Poly(dI-dC) (Sigma) und 2 μg/μl T4g32p (Ambion) (Endkonzentration: 75 ng/μl = 1,5 μg pro Probe) zur Erststrang-Synthese zugegeben. Die Zweitstrang-Synthese erfolgt mit exogenen Primern. Nach der Aufreinigung der cDNA über ein Säulensystem wird die IVT unter Verwendung einer T7-Polymerase durchgeführt und die entstandene aRNA wiederum über ein Säulensystem aufgereinigt. In der zweiten Runde der Amplifikation werden zur Generierung der cDNA für die Erststrang-Synthese exogene Primer und für die Zweitstrang-Synthese Oligo(dT)T7-Primer verwendet. Eine zweite IVT wird mittels des BioArray™ High Yield™ Transcription Labeling Kit (ENZO Life Science) durchgeführt. Diese IVT dient auch zur Markierung der aRNA mit biotinylierten Nukleotiden (dUTP und dCTP). Die Fragmentlängen der Mehrheit der aRNA-Produkte (2-Runden-Amplifikation) liegen nach Angaben des Herstellers im Bereich von bis zu 600 bp. Da die meisten Oligonukleotid-Sonden des Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarrays ca. 600 bp vom 3'-Ende der Transkripte entfernt liegen, sind diese beiden Methoden kompatibel.

2.2 Durchflusszytometrische Isolierung normaler B-Zellpopulationen

Die normalen B-Zellpopulationen wurden von Frau Dr. Ines Pfeil isoliert. Alle Schritte fanden bei 0-4°C statt, um Änderungen im Genexpressionsmuster zu verhindern. Naive (N) und Gedächtnis-B-Zellen (M) wurden aus dem Blut von fünf gesunden Spendern isoliert. Fünf Tonsillen, die der Isolierung von Zentrozyten (CC), Zentroblasten (CB) und Plasmazellen (PC) dienten, wurden im Rahmen von Routine-Tonsillektomien entnommen. Mononukleäre Zellen aus Blut und Tonsillen wurden durch eine Ficoll-Dichtezentrifugation (Amersham) aufgereinigt. Um naive B-Zellen aufzureinigen wurden zunächst durch magnetische Zellseparation (*magnetic-activated cell sorting* MACS; Miltenyi Biotech) CD27⁺ (Gedächtnis-B-Zellen, T-Zellsubpopulationen) und CD11b⁺ (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK Zellen) Zellen depletiert. Dann wurden IgD⁺ CD27⁻ Zellen mittels FACS aufgereinigt. Gedächtnis-B-Zellen wurden aufgereinigt durch MACS-Depletion von CD11b⁺ und CD3⁺ Zellen, gefolgt von einer FACS-Sortierung von CD20⁺ CD27⁺ Zellen. Tonsilläre GC-B-Zellen und Plasmazellen wurden anhand folgender Markerexpression FACS-sortiert: CD20^{hoch} CD38⁺ CD77⁺ (CB), CD20^{hoch} CD38⁺ CD77⁻ (CC) und CD20^{schwach} CD38^{hoch} (PC). Obwohl die Expression von CD77 bisher als Marker zur Unterscheidung von CC und CB genutzt wurde (Pascual et al., 1994), ist mittlerweile klar, dass CD77 kein geeigneter Marker ist, um die beiden GC-B-Zellsubpopulationen für Genexpressionsanalysen voneinander zu trennen (Högerkorp und Borrebaeck, 2006; Klein et al., 2003). Je 2000 Zellen (N, M, CC, CB, PC) wurden in RNase-freie Reaktionsgefäße (Eppendorf) mit 50 µl Purescript Lysis Puffer (Gentra) sortiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Reinheit der verwendeten Zellen lag über 95%. Für die Analyse der B-Zell-spezifischen Genexpression wurden zusätzlich Genexpressionsprofile humaner tonsillärer CD4⁺- und CD8⁺-Zellen verwendet, die freundlicherweise von Frau Susan Eckerle (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt wurden.

2.3 Lasermikrodissektion

Mit dem seit 1993 kommerziell erhältlichen P.A.L.M. Laser-Mikroskop-System konnte erstmals die Kraft des fokussierten Lichts zur Mikrodissektion eingesetzt werden. Der P.A.L.M.® Robot-MicroBeam wird zur lasergestützten Mikromanipulation (*Laser Microbeam Microdissection*, LMM) und zum lasergestützten Zellkatapultieren (*Laser Pressure Catapulting*, LPC) genutzt (*Laser Microdissektion and Pressure Catapulting*, LMPC). Der P.A.L.M.® Robot-MicroBeam besteht aus einem gepulsten Stickstoff UV_a-Laser (377 nm Wellenlänge, max. 20 Pulse pro Sekunde, 3 ns Pulsdauer) von hoher Strahlqualität, der durch den Auflichtfluoreszenzstrahlengang in ein inverses Mikroskop eingekoppelt ist (Abb. 6) (Fink und Bohle, 1999; Schütze und Clement-Sengewald, 1994).

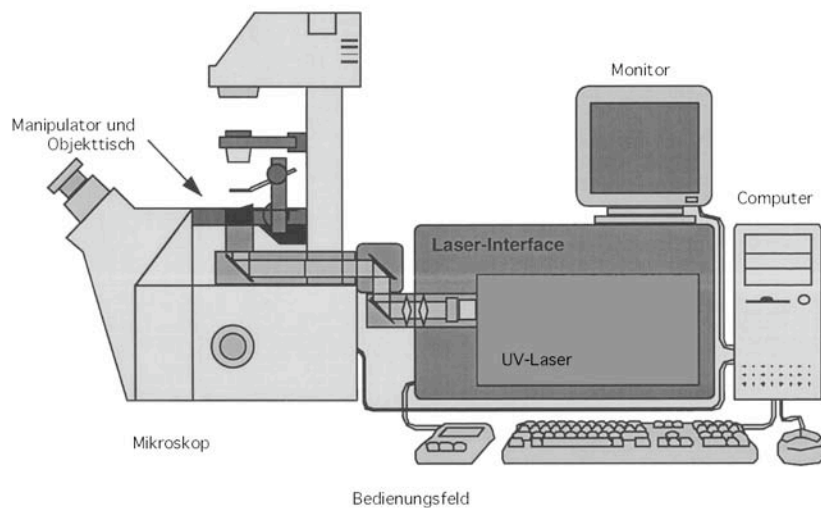


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des P.A.L.M.® Robot-MicroBeam

Die hohe Photonendichte im Laserfokus (bis zu $10^{12} \text{ W cm}^{-2}$) kann zur Ablation und zum Schneiden von biologischen Strukturen genutzt werden (Schütze et al., 1998). Das physikalische Prinzip des Schneidens durch den Laser basiert auf einem lokal begrenzten ablativen Photodekompositions-Prozess ohne Hitzeentwicklung, sog. kalter Ablation (Srinivasan, 1986). Da die hohe Energiedichte nur im schmalen Fokus des Laserstrahls entsteht, werden umliegende Zellen nicht durch die Laser-Mikromanipulation zerstört. Die angewandte Wellenlänge des Lasers von 337 nm liegt weit entfernt vom Absorptions-Maximum der DNA und RNA (260 nm) und verhindert so die Zerstörung von genetischem Material im umliegenden Gewebe (Burgemeister et al., 1999; Schütze et al., 1998). Ein motorisierter computergesteuerter Mikroskoptisch und ein dreidimensional beweglicher Mikromanipulator (ebenfalls motorisiert und computergesteuert) sind mit dem P.A.L.M.® Robot-MicroBeam verbunden (Abb. 6), was eine nanometergenaue Objektpositionierung erlaubt. Der Durchmesser des Laserfokus ist abhängig von der numerischen Apertur des Objektivs und dem Absorptionsverhalten des Gewebes (Schütze et al., 1998). Mit dem P.A.L.M.® Robot-MicroBeam kann ein Fokusbereich von weniger als $1 \mu\text{m}$ erreicht werden. Unter optischer Kontrolle können einzelne Zellen oder Zellareale beliebiger Form und Größe bis hin zu subzellulären Strukturen wie Nuklei oder Chromosomen sehr akkurat durch LMM ausgeschnitten werden. Um mechanischen Kontakt und damit auch die Gefahr von Kontamination während der Isolierung der Zellen bzw. Zellareale zu vermeiden, wurde die Technik des LPC entwickelt. LPC basiert auf der Kraft des Laserstrahldruckes, die sich durch die extrem hohe Photonendichte des fokussierten Laserstrahls unter der Probe entwickelt. Die Probe wird von der Photonenwolke mit hoher Geschwindigkeit getragen. Die isolierte Probe kann mit einem einzigen gezielten Laserpuls in den Deckel eines LPC-Mikrozentrifugenröhrchens katapultiert werden. Zellareale mit einem Durchmesser bis zu $1000 \mu\text{m}$ können bis zu 8 mm gegen die Erdanziehung katapultiert werden (Schütze und Lahr, 1999). Die Morphologie der katapultierten Probe bleibt komplett er-

halten, wenn man Gewebe auf Objektträgern mit Folie (1,35 µm Polyethylen-Membran) benutzt (*Microbeam microdissection of membrane-mounted native tissue*, microbeam MOMeNT-Technik) (Böhm et al., 1997). Die Folie wirkt wie ein stabilisierendes Element, wodurch die Fragmentierung verhindert wird. Werden normale Objektträger ohne Folie benutzt, resultiert LPC in Fragmentierung der Probe. Dies hat aber keinen Einfluss auf DNA- oder RNA-Qualität (Schütze und Lahr, 1998; Schütze und Lahr, 1999).

2.3.1 Auswahl der Lymphknotenbiopsien von Lymphompatienten

Da für Genexpressionsanalysen nur sehr gut erhaltene RNA verwendet werden kann, wurden alle Lymphome auf ihre RNA-Qualität überprüft. Gesamt-RNA aller Lymphome wurde von Ganzschnitten mittels Trizol (Invitrogen), gefolgt von einer Säulen-Aufreinigung mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Zur Analyse der RNA-Qualität wurde die isolierte Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers auf 2100 Bioanalyzer Nano Assays (Agilent) geladen und vermessen.

Immunhistochemische Standard-Färbeprotokolle beinhalten zeitintensive Inkubationsschritte in wässrigen Lösungen, die zu signifikanten Verlusten und Degradation von RNA führen. Sie sind daher nicht geeignet, wenn die RNA im Weiteren für Genexpressionsanalysen verwendet werden soll. Die meisten histologischen Standard-Färbeprotokolle wie Hämalaun & Eosin (H&E) sind mit der Isolation von qualitativ hochwertiger RNA kompatibel, jedoch ist die Identifizierung bestimmter Zelltypen schwieriger oder unmöglich. Die Identifizierung von L&H-Zellen ist auch ohne Immunhistochemie - nur mit H&E Färbung - möglich, wenngleich schwieriger. Es wurden daher NLPHL-Fälle ausgewählt, die in ausreichender Zahl morphologisch und histologisch gut identifizierbare L&H-Zellen aufwiesen.

Aus allen Fällen mit guter RNA-Qualität und gleichzeitig guter Morphologie und Histologie wurden fünf anhand der WHO-Klassifikation diagnostizierte NLPHL, 12 cHL, 4 TCRBL, 11 DLBCL, 5 FL und 5 BL ausgewählt (zur Auswahl der DLBCL, FL und BL siehe auch 2.1.3.3). Einer der NLPHL-Fälle (NLPHL 3) wurde von einem Lymphknoten mikrodisssektiert, der von einem Rezidiv-Patienten stammt. Dieser Lymphknoten wies zusätzlich in einem anderen Areal eine Transformation zu einem DLBCL auf, die bei der Erstdiagnose noch nicht vorhanden war. Auch der DLBCL-Anteil des Lymphknotens wurde mikrodisssektiert und ging als 1/11 DLBCL-Fällen in die Genexpressionsanalysen ein (DLBCL 3). Die Reinheit der durch Lasermikrodisssektion isolierten Zellaliquots wird auf ca. 95% geschätzt.

2.3.2 Färbung der Gefrierschnitte der Lymphombiopsien

RNase-freie PEN-membranbespannte Objektträger (P.A.L.M.) wurden 30 min. mit UV-Licht bestrahlt, um elektrostatische Aufladungen zu minimieren und evtl. Kontaminationen zu eliminieren. Von Lymphknotenbiopsien von Lymphompatienten wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf o.g. Objektträger aufgezogen. Die

Schnitte wurden kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit Hämalaun (nach Meyer), das 200 U/ml RNase-Inhibitor (Roche) enthielt, für 4 min. inkubiert. Die Schnitte wurden 2 min. in RNase-freiem Wasser (Eppendorf) gewaschen, 15 sek. in 2% Eosin inkubiert, erneut in RNase-freiem Wasser (Eppendorf) gewaschen und dann für ca. 2-3 Stunden bei 37°C getrocknet.

2.3.3 Lasermikrodissektion der Lymphomzellen

Die Lasermikrodissektion wurde mit der *Laser Microdissection and Pressure Catapulting* (LMPC) Technik eines UV-Lasers der Firma P.A.L.M. durchgeführt. Lymphomzellen des NLPHL, cHL und TCRBL wurden als Einzelzellen mikrodissektiert. Sechs der zwölf cHL wurden von Herrn Dr. Enrico Tiacchi (Institut für Zellbiologie und Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen) lasermikrodissektiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei den DLBCL-, FL- und BL-Fällen wurden Fälle mit mehr als 95% Tumorzellanteil ausgewählt, so dass diese Lymphomzellen in Arealen mikrodissektiert werden konnten. Die Zellen wurden direkt in Purescript Lysepuffer (Gentra) katapultiert und in Gruppen von 1000-2000 Zellen gepoolt, bei 3000 x g zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.4 Genomweite Genexpressionsanalyse

2.4.1 RNA-Isolierung für die Genexpressionsanalyse

Die in Purescript Lysepuffer (Gentra) gelagerten Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das Purescript RNA Extraction Protokoll (Gentra) modifiziert. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 4°C, um die RNA zu schützen und die RNA-Pellets fester zu machen. Die Mengen aller Reagenzien wurden auf ein Zehntel der Mengen, die im Standardprotokoll angegeben sind, reduziert. Pro Reaktion wurden 80 µg Glykogen (Roche) als Fällhilfe eingesetzt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser (Eppendorf) durch Inkubation für 30 min. bei 4°C resuspendiert. Zur Verbesserung der RNA-Resuspendierung wurden die Proben weitere 10 min. bei 70°C inkubiert und dann für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren.

2.4.2 Generierung von cRNA

Zur Generierung und Amplifizierung der cRNA mittels linearer *in vitro* Transkription aus der RNA der FACS-sortierten und mikrodissektierten Zellen wurde das Protokoll des T7 RNA Polymerase-basierte RiboAmp™ RNA Amplification Kit, Version C (Arcturus) modifiziert. Abweichend von den Herstellerangaben wurden zum Mastermix der ersten cDNA-Synthese pro Reaktion 1,5 µg T4 gp32 protein (Ambion) zugegeben, um die Spezifität

und die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen. Der ersten cDNA-Synthese folgt eine in vitro Transkription (IVT) und eine zweite cDNA-Synthese mit Hexamer-Primern.

Die nachfolgende zweite IVT dient nicht nur der weiteren Amplifikation, sondern auch der Markierung der cRNA mit biotinylierten Nukleotiden. Für die zweite IVT und Labeling-Reaktion wurde der BioArray™ High Yield™ Transcription Labeling Kit (ENZO Life Science) mit einem modifizierten Protokoll verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurden 100 ng cDNA der zweiten cDNA-Synthese eingesetzt. Die Inkubationszeit der zweiten IVT wurde auf 8 Stunden verlängert und die ENZO T7 RNA Polymerase wurde durch die T7 RNA Polymerase der Firma Stratagene ersetzt. Statt 150 U wurden 300 U T7 RNA Polymerase pro Reaktion eingesetzt. Die Aufreinigung der amplifizierten und biotin-markierten cRNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Die cRNA-Ausbeuten und Elektropherogramme wurden nach der ersten und zweiten IVT auf 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico Assays bzw. RNA 6000 Nano Assays (Agilent) überprüft. Die aufgereinigte biotinylierte cRNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Microarray Hybridisierung, Waschen und Scannen

Vor der Hybridisierung wurde die biotin-markierte cRNA nach Angaben des Herstellers (Affymetrix) chemisch fragmentiert und auf 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assays (Agilent) überprüft. Die Hybridisierung der fragmentierten biotin-markierten cRNA erfolgte nach Herstellerangaben (Affymetrix). Nach der Hybridisierung wurden die Microarrays in einer Fluidics Station FS450 (Affymetrix) nach Angaben des Herstellers mit dem Euk-GE-WS2v5_45-Protokoll gewaschen und gefärbt. Die Microarrays wurden bei 4°C dunkel verpackt gelagert und transportiert. Innerhalb von max. 10 Stunden nach Beendigung des Wasch- und Färbvorgangs wurden die Microarrays im Labor von Dr. Detlev Güssow, Firma Merck KGaA in Darmstadt, mit einem GeneChip®Scanner 3000 (Affymetrix) nach Angaben des Herstellers gescannt.

2.4.4 Statistische Analyse der Microarray Daten

Alle statistischen Analysen wurden mit Unterstützung von Frau Claudia Döring (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main und Institut für Informatik, Universität Frankfurt am Main) und Herrn Prof. Dr. Dirk Metzler (Institut für Informatik, Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

2.4.4.1 Überprüfung der Microarray Qualität

Die Datenanalyse zur Qualität der technischen Microarray-Durchführung wurde mit der GCOS 1.4 Software (Affymetrix) durchgeführt. Standard Algorithmen Parameter wurden verwendet und die gemessenen Signalintensitäten jedes *Probe sets* wurden auf einen

Zielwert (*target value*) von 2000 für die 100 Kontroll-Transkripte, die auf jedem Microarray werksseitig vorhanden sind, skaliert (http://www.affymetrix.com/Auth/support/downloads/mask_files/hgu133_plus_2norm.zip). Zusätzlich wurden die „.DAT“-Dateien optisch auf mögliche Artefakte überprüft. Skalenfaktoren (*scaling factors*, SF), prozentuale Signalpräsenz (*Present calls*, %P) und Signalverhältnisse (*signal ratios*) von *Probe sets*, die unterschiedliche Bereiche in Transkripten abdecken (3' und Mitte), waren unter allen analysierten Proben vergleichbar, mit vergleichbaren Variationen in Proben aller verschiedener Gruppen (%P durchschnittlich 24,6 (14,9-41,8); SF durchschnittlich 7 (0,5-21,1); 3'M durchschnittlich 7,6 (1,8-13,1)). Das deutet darauf hin, dass verschiedene Isolierungsmethoden (LMPC oder FACS) oder leichte Unterschiede in der RNA-Qualität lebendsortierter normaler B-Zellpopulationen und mikrodisektierter Lymphome keinen messbaren Einfluss auf die Genexpressionsanalyse haben. Alle weiteren statistischen Analysen wurden mit der frei erhältlichen Statistik-Software „R“ durchgeführt (R Development Core Team, 2005). Zusätzliche Software Pakete für „R“ wurden aus dem ebenfalls frei erhältlichen „Bioconductor“-Projekt übernommen (Gentleman et al., 2004).

2.4.4.2 Microarray Prä-Prozessierung

Die Probelevel-Normalisierung wurde mit der Varianzstabilisierungsmethode nach Huber et al. durchgeführt (Huber et al., 2002). Diese Methode rechnet die Varianz eines *Probes* annähernd unabhängig von der erwarteten Expressionsstärke. Die Parameter (Offset- und Skalenfaktor) wurden für jeden Microarray unter der Annahme abgeschätzt, dass die Mehrheit der Transkripte zwischen den analysierten Proben nicht differentiell ausgeprägt ist. Unter Berücksichtigung der rechenbetonten Komplexität des Algorithmus wurden die Parameter anhand einer randomisierten *Probe*-Auswahl abgeschätzt und dann auf den gesamten Microarray transformiert.

Die *Probe set* Summierung (*probe set summarization*) wurde mittels der robusten Medianglättungsmethode (Tukey, 1977) anhand der normalisierten Daten durchgeführt. Für jedes *Probe set* wurde ein additives Glättungsmodell mit einer logarithmischen Skala zur Basis 2 über den gesamten Microarray angepasst, das die verschiedenen Affinitäten der *Probes* über den *Probe*-Effekt berücksichtigt.

2.4.4.3 Unsupervised Hierarchical Clustering

Ein Unsupervised („nicht-überwachtes“, „nicht-beeinflusstes“) Hierarchisches Clustering wurde für Gene mit einer Standardabweichung ≥ 1 über alle *Probes* mittels der Manhattan-Distanz und Durchschnittsverknüpfungsmethode (*average linkage method*) durchgeführt. Um die Stabilität der resultierenden Cluster zu überprüfen, wurde Pvcust (Suzuki und Shimodaira, 2006) angewandt, ein „R“ Software-Paket zur Bewertung der Unsicherheit bei hierarchischen Cluster-Analysen. Zwei Methoden zur Bewertung des p-Wertes wurden verwendet: AU (*Approximately unbiased*) p-Wert und BP (*Bootstrap Probability*)

p-Wert. Der BP-Wert wird über eine Standard-Bootstrap-Wiederholungsprobennahme (*standard bootstrap resampling*) errechnet. Suzuki et al., bewiesen, dass der AU-Wert, der über eine multi-Skalen-Bootstrap-Wiederholungsprobennahme (*multi-scale bootstrap resampling*) berechnet wird, ein besserer Annäherungswert an einen erwartungstreuen p-Wert ist (Suzuki und Shimodaira, 2006).

2.4.4.4 Heatmap

Eine Heatmap (Hitzekarte) ist eine Falschfarben-Darstellung einer Matrix numerischer Werte. Heatmaps wurden mit der Spotfire® DecisionSite® 9.1, 1996-2007 Software (Spotfire) erstellt.

2.4.4.5 Differentielle Genexpression

Viele der Gene, die auf dem Microarray repräsentiert sind, sind in den meisten Proben nicht ausgeprägt oder zeigen nur eine geringe Variabilität unter den Proben. Für alle paarweisen Vergleiche wurde zunächst ein globaler Filter angewandt, um die Dimension des Microarrays zu reduzieren. Weiterhin wurde einen Intensitätsfilter (die Signalintensität eines *Probe sets* soll über 100 in mindestens 25% der Proben sein, wenn die zu vergleichenden Gruppen gleich groß sind) und ein Varianzfilter (der Quartilsabstand der \log_2 Intensitäten soll mindestens 0,5 betragen, wenn die zu vergleichenden Gruppen gleich groß sind) angewandt. Wenn die zu vergleichenden Gruppen nicht gleich groß waren, sollten die Signalintensitäten eines *Probe sets* über 100 in mindestens einer Fraktion α der Proben sein, wobei α die kleinere Gruppengröße minus 1, dividiert durch die Gesamtanzahl der Proben der zwei Gruppen ist. Der Quartilsabstand der \log_2 Intensitäten soll mindestens 0,1 betragen, wenn die zu vergleichenden Gruppen nicht gleich groß sind. Unter der Annahme, dass die Varianz in beiden Gruppen gleich groß ist, wurden nach der globalen Vorfilterung p-Werte mit einem Zwei-Proben t-Test (*two sample t-test*) berechnet, um diejenigen Gene zu identifizieren, die zwischen den beiden Gruppen differentiell ausgeprägt sind. Um dem Multiplen-Testen-Problem Rechnung zu tragen, wurden auch Falschpositivraten (*False discovery Rate, FDR*) nach Benjamini und Hochberg berechnet (Hochberg und Benjamini, 1990). Änderungsverhältnis (*Fold Change, FC*) zwischen zwei Gruppen wurde für jedes *Probe set* berechnet. Differentiell ausgeprägte Gene wurden unter den Kriterien des FC und FDR ermittelt.

2.4.4.6 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) wurde bei vorselektionierten Genen und vorbestimmten Gruppen angewandt. Die erste Hauptkomponente wurde als eine Expressionssignatur eines gegebenen Gensets genutzt und dann auf die Proben aller Gruppen angewandt. Anschließend wurde ein Wilcox-Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen angewandt.

2.4.5 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden auf Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten von Tonsillen durchgeführt, die bei Routine-Tonsillektomien entnommen wurden, und auf Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten Lymphknotenbiopsien von Patienten, die an NLPHL erkrankt waren. Die eingesetzten Antikörper und Färbeprotokolle sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Bedingungen für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper-spezifität	Firma und Bestell-Nr.	Vorbehandlung	Protein-block	Antikörper-Verdünnung	Inkubation mit Erst-antikörper	Detektionssystem
CTSB	abcam ab26395	nein	nein	1:20	4°C, ÜN	CSA (Dako)
MMP9	Labvision RB-1539-P	S, 22 min., pH9	nein	1:100	RT, 30 min.	REAL-HRP (Dako)
MMP12	abcam ab5734	S, 22 min., pH9	nein	1:200	RT, 30 min.	REAL-HRP (Dako)
LGALS3	Novocastra NCL-GAL3	PC, 45 sek., pH8	nein	1:400	RT, 30 min.	REAL-AP (Dako)
IL21R	ProteinTech 10533-1-ap	PC, 2 min., pH8	ja	1:50	RT, 30 min.	REAL-AP (Dako)
EOMES	Chemicon AB9618	PC, 2 min., pH8	ja	1:500	RT, 30 min.	REAL-AP (Dako)
p-STAT1	Zytomed 18-2400	S, 22 min., pH9	nein	1:100	RT, 30 min.	REAL-HRP (Dako)
NF-κB p65	Chemicon MAB3026	PC, 2 min., pH6	nein	1:50	RT, 30 min.	REAL-HRP (Dako)
ERK	Cell Signaling #9102	S, 32 min., pH6	nein	1:50	4°C, ÜN	REAL-HRP (Dako)
p-ERK	Cell Signaling #4376	S, 32 min., pH6	nein	1:50	4°C, ÜN	REAL-HRP (Dako)

S, Dampfgerät (*steamer*); PC, Dampfkochtopf (*pressure cooking*); ÜN, über Nacht; RT, Raumtemperatur; CSA, Catalyzed Signal Amplification (CSA) Kit K1500; REAL-HRP, Dako REAL™ Envision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse K5007; REAL-AP, Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse K5005; Proteinblock serum-free, ready to use, Dako X0909

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressionsanalyse weniger Zellen

Zur Durchführung einer Genexpressionsanalyse mittels des Affymetrix-Standardprotokolls werden 1-5 μg Gesamt-RNA (entsprechen 10^6 Zellen) benötigt. Da HRS- und L&H-Zellen jedoch nur ca. 1% des Tumordinfiltrats ausmachen und bislang keine verlässlichen MACS- oder FACS-Aufreinigungsprotokolle für diese Zellen zur Verfügung stehen, müssen die HRS- und L&H-Zellen mittels Lasermikrodissektion isoliert und ihre RNA anschließend amplifiziert werden, um ausreichend cRNA für die Hybridisierung auf Affymetrix GeneChips® zu erhalten (Abb. 7). Dazu wurden geeignete Protokolle etabliert, um die RNA aus geringen Zellmengen optimal zu isolieren und zu amplifizieren, die im Folgenden anhand der wichtigsten Experimente erläutert werden.

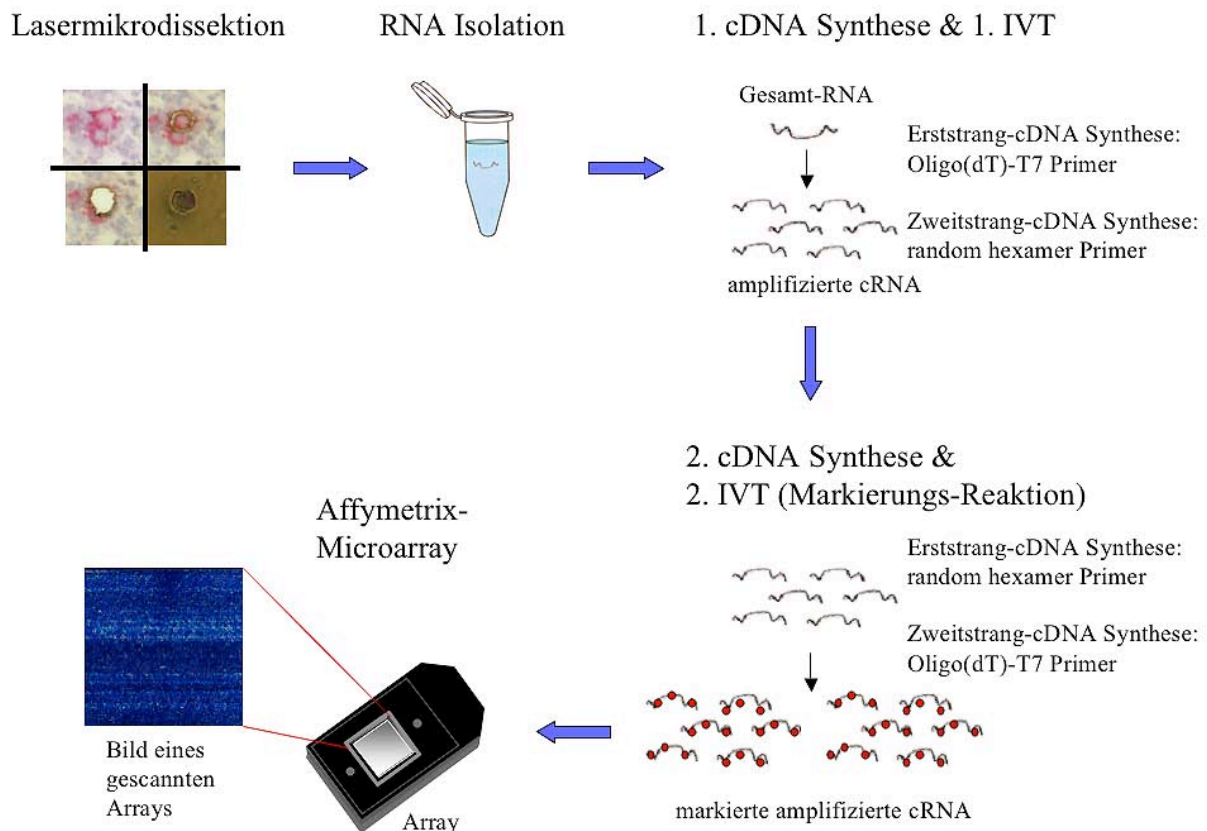


Abbildung 7: Schematische Übersicht der Arbeitsschritte der Genexpressionsanalyse primärer L&H- und HRS-Zellen

Nach der Lasermikrodissektion der L&H bzw. HRS-Zellen wird die zelluläre Gesamt-RNA isoliert, mittels eines 2-Runden T7 RNA Polymerase-basierten Protokolls amplifiziert und auf Affymetrix GeneChips® hybridisiert.

3.1.1 Etablierung einer RNA-Isolationsmethode ausgehend von geringen Zellmengen

Es wurden vier verschiedene Methoden zur Isolierung von RNA, ausgehend von geringen Zellmengen, getestet. Zum einen wurden die Zellen mittels 0,5% NP40 lysiert. Zudem wurden zwei verschiedene Kits getestet, die auf GCN (Guanidin-Isothiocyanat)-vermittelter Lyse der Zellen und Bindung der RNA an Säulen basieren (RNeasy® Mini Kit, Qiagen und StrataPrep® Total RNA Microprep Kit, Stratagene). Ein weiterer Kit, der getestet wurde, war der Purescript® RNA Isolation Kit (Gentra), der Salzpräzipitation mit RNase-Inhibitoren kombiniert.

Pro Kit wurden je 6 verschiedene Aliquots von 10 FACS-sortierten KMH2- und Jurkat-Zellen und je zwei Pufferkontrollen analysiert. Die RNA wurde isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression von CD52 analysiert (Tabelle 3). CD52 wird auf Lymphozyten und Monozyten ausgeprägt (also auch auf Jurkat Zellen, die von T-Lymphozyten abstammen), aber nicht auf HRS-Zellen. Dies wurde zuvor an Gesamt-RNA von 10^6 Zellen überprüft.

Tabelle 3: Test verschiedener RNA-Isolationsmethoden ausgehend von geringen Zellmengen

RNA-Isolationsmethode	Zelltyp	CD52-positive Proben/analysierte Proben
NP40 (0,5% in PCR Puffer)	KMH2 Negativkontrolle	0/6 0/2
(Zellyse durch Detergenz)	Jurkat Negativkontrolle	0/6 0/2
RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	KMH2 Negativkontrolle	0/6 0/2
(GCN/RNA-Bindung an Säulen)	Jurkat Negativkontrolle	0/6 0/2
StrataPrep® Total RNA Microprep Kit (Stratagene)	KMH2 Negativkontrolle	0/6 0/2
(GCN/RNA-Bindung an Säulen)	Jurkat Negativkontrolle	4/6 0/2
Purescript® RNA Isolation Kit (Gentra)	KMH2 Negativkontrolle	1/6 0/2
(Salzpräzipitation/RNase-Inhibitoren)	Jurkat Negativkontrolle	5/6 0/2

Getestet wurden vier verschiedene Methoden zur Isolierung von RNA ausgehend von geringen Zellmengen. Pro Methode wurden je 6 verschiedene Aliquots von 10 FACS-sortierten KMH2 und Jurkat Zellen und je zwei Pufferkontrollen analysiert. Die RNA wurde isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression von CD52 analysiert. CD52 wird auf Lymphozyten, Monozyten und Jurkat Zellen ausgeprägt, aber nicht auf HRS-Zellen.

Die Anwendung von NP40 und des RNeasy® Mini Kits zeigte kein positives Ergebnis. Die RNA, die mit dem StrataPrep® Total RNA Microprep Kit (Stratagene) isoliert wurde, zeigte in 4/6 Jurkat-Zellaliquots Expression von CD52. Mit der mittels des Purescript® RNA

Isolation Kits (Gentra) isolierten RNA konnten in 5/6 Jurkat-Zellaliquots, allerdings auch in 1/6 KMH2-Zellaliquots, Expression von CD52 nachgewiesen werden. Die Pufferkontrollen beider Kits waren negativ.

Da die Effizienzen beider Kits vergleichbar waren, fiel die Entscheidung aus zwei Gründen zugunsten des Purescript® RNA Isolation Kits der Firma Gentra: (1) Der StrataPrep® Total RNA Microprep Kit enthält β -Mercaptoethanol im Lysepuffer. Dieser Lysepuffer muss in den Deckel des Reaktionsgefäßes vorgelegt werden, in den die L&H- und HRS-Zellen während der Lasermikrodissektion katapultiert und gepoolt werden. Diese Prozedur dauert einige Zeit. Somit ist die Verwendung des StrataPrep® Total RNA Microprep Kits unter diesen Bedingungen aus gesundheitlichen Gründen nicht empfehlenswert. (2) Der Purescript® RNA Isolation Kit ermöglicht, isolierte RNA in jedem beliebigen Volumen zu resuspendieren, was für nachfolgende cDNA-Synthesen und/oder Amplifikationen unter Verwendung verschiedener Kits sehr vorteilhaft ist.

3.1.2 Etablierung einer cDNA-Synthese ausgehend von geringen RNA-Mengen

Um ein geeignetes Protokoll zur cDNA-Synthese ausgehend von geringen RNA-Mengen zu etablieren, wurden zwei verschiedenen Kits, der Qiagen® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) und der Titan™ One Tube RT-PCR Kit (Roche), getestet. Beide „Ein-Schritt (*One-Step*)“-Kits enthalten optimierte Komponenten, die es erlauben, die Reverse Transkription (RT) und die PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Der Qiagen Kit enthält zusätzlich eine sog. „*Q-Solution*“, ein Additiv, das die Amplifikation schwieriger *Templates* durch die Veränderung des Schmelzverhaltens der Nukleinsäuren erleichtern soll.

In einem ersten Experiment wurde die RT mit jeweils 40 ng Gesamt-RNA der Zelllinien KMH2 und Jurkat bei 50°C unter Zugabe des genspezifischen Primers für CD52 (Jurkat RNA) und TARC (KMH2 RNA) durchgeführt. Anschließend folgte eine PCR (40 Zyklen). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

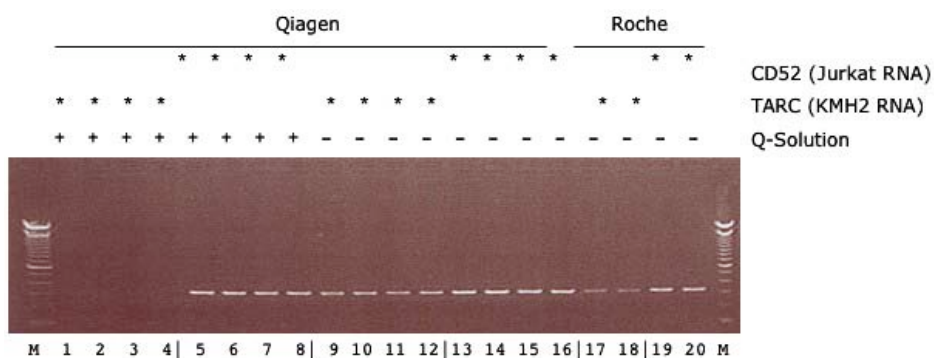


Abbildung 8: Test zweier verschiedener „Ein-Schritt“-RT-PCR-Kits ausgehend von geringen RNA-Mengen

Getestet wurden zwei verschiedene „Ein-Schritt“-RT-PCR-Kits ausgehend von geringen RNA-Mengen. Beide Kits wurden mit genspezifischen Primern für CD52 (Jurkat RNA) und TARC (KMH2 RNA) getestet. Die im Qiagen Kit enthaltene „*Q-Solution*“ wurde ebenfalls in verschiedenen Kombinationen getestet. (M, 100 bp Leiter)

Die Verwendung der „Q-Solution“ im Qiagen Kit scheint die RT-PCR für TARC zu hemmen. Auch die RT-PCR für CD52 ist ohne „Q-Solution“ etwas effizienter, was an der Stärke der PCR-Banden zu sehen ist. Der Roche Kit gibt für beide RT-PCRs positive Ergebnisse.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse zu testen und die Effizienz beider Kits besser quantifizieren zu können, wurde das Experiment mit verschiedenen RNA-Verdünnungen der Zelllinie Jurkat (entsprechend 200 bis 0,2 Zelläquivalenten) für die CD52 RT-PCR wiederholt (Abb. 9).

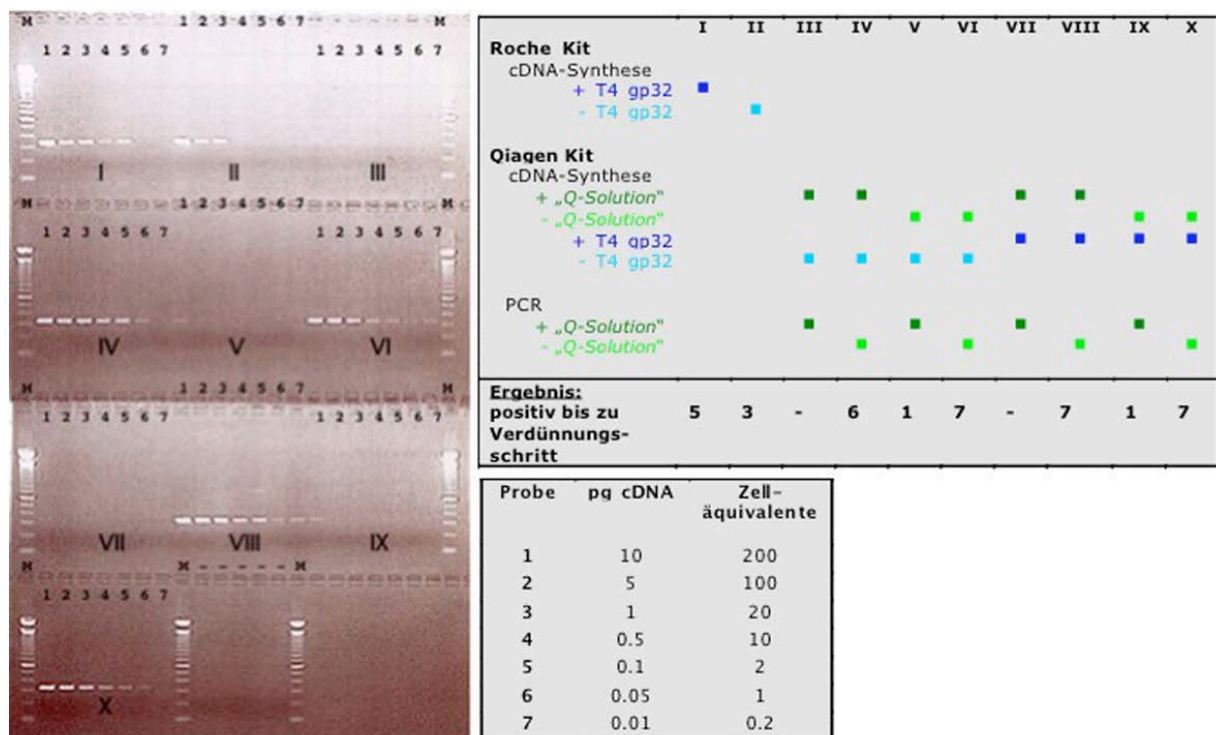


Abbildung 9: Test zweier verschiedener „Ein-Schritt“-RT-PCR Kits anhand von Verdünnungsreihen

Die beiden verschiedenen „Ein-Schritt“-RT-PCR-Kits (Qiagen und Roche) wurden anhand von Verdünnungsreihen von 10-0,01 pg cDNA aus Jurkat-Gesamt-RNA entsprechend 200-0,02 Zelläquivalenten getestet. Mit der genspezifischen RT-PCR wurde die Expression von CD52 analysiert. In den Ansätzen I-X sind die verschiedenen Kombinationen der beiden Kits mit und ohne T4 gp32 und der „Q-Solution“ des Qiagen Kits dargestellt. (M, 100 bp Leiter)

Da für das T4 Gen 32 Protein (T4 gp32) beschrieben wurde, dass es die Ausbeute und/oder Spezifität von PCR Produkten verbessert (Schwarz et al., 1990) und den inhibitorischen Effekt von Reversen Transkriptasen auf die PCR reduziert (Chandler et al., 1998), wurde es zusätzlich in Verbindung mit beiden Kits getestet. Die Kombinationen VI (cDNA-Synthese und PCR ohne „Q-Solution“, ohne T4 gp32), VII (cDNA-Synthese mit „Q-Solution“ und mit T4 gp32, PCR ohne „Q-Solution“) und X (cDNA-Synthese und PCR ohne „Q-Solution“, mit T4 gp32) des Qiagen Kit zeigten die besten Effizienzen, d.h. sie zeigten

bis zur Verdünnung auf 0,2 Zelläquivalente Expression von CD52. Die Zugabe der „Q-Solution“ zur Reaktion erscheint in Bezug auf die Effizienzen der PCR und/oder cDNA-Synthese problematisch (vgl. auch Abb. 8) und wurde daher nicht weiter verwendet. Die Zugabe des T4 gp32 scheint jedoch einen positiven Einfluss auf die cDNA-Synthese zu haben (vgl. Ansatz I vs II und III-VI vs VII-X). Daher wurde der Qiagen® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) ohne Zugabe von „Q-Solution“, allerdings von 1,5 µg T4 gp32 pro Reaktion verwendet, um nun die Anwendbarkeit dieses Protokolls auf lasermikrodissektierte Zellen zu untersuchen. Dazu wurden humane T-Zellen aus Blut isoliert und mittels MACS angereichert (Abb. 10).

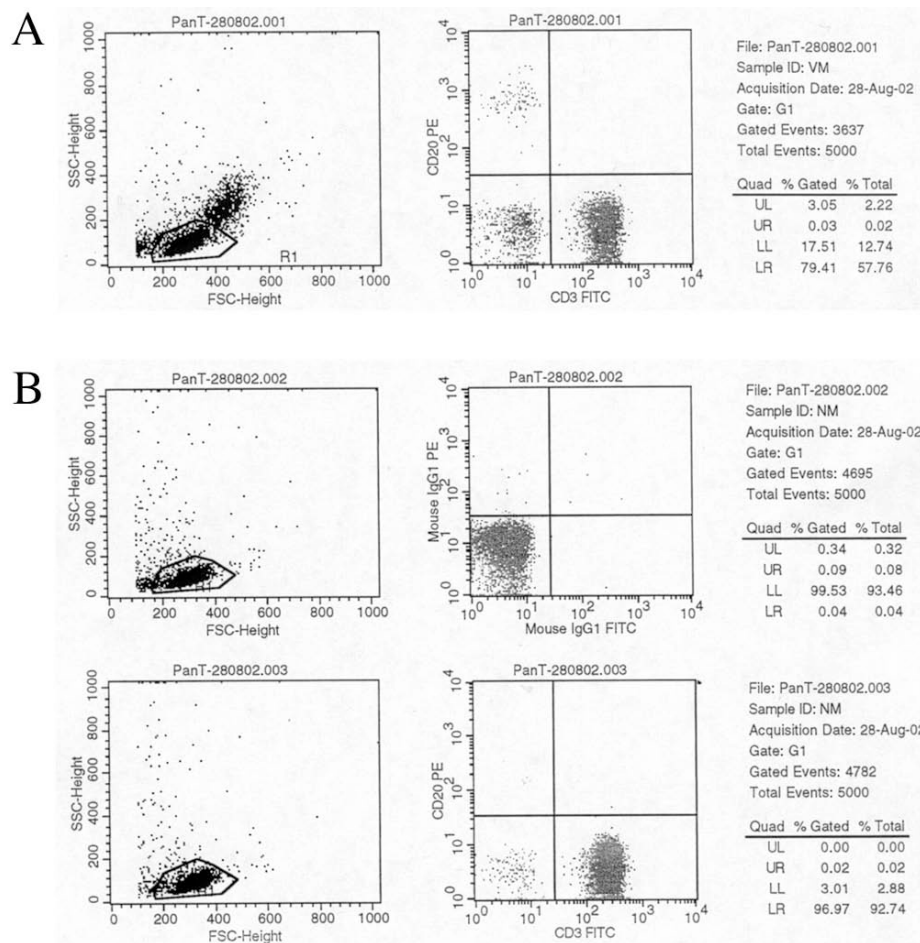


Abbildung 10: MACS-Anreicherung humaner T-Zellen aus Blut

(a) humane Lymphozyten aus Blut vor der MACS-Aufreinigung

(b) MACS-Anreicherung der T-Zellen mittels Pan T-Zell Kit. FACS-Analyse der Zellen für die Expression von CD3/CD20 und Isotypenkontrolle (Mouse IgG1 FITC).

Von diesen angereicherten T-Zellen sowie von KMH2-Zellen wurden Zytospins angefertigt. Die Zellen wurden unter RNase-freien Bedingungen H&E (Hematoxilin & Eosin) gefärbt, als Einzelzellen lasermikrodissektiert und jeweils in Gruppen von 1, 5, 10, 25 und 50 Zellen gepoolt. Die Zellen/Zellgruppen wurden zusammen mit Pufferkontrollen mittels RT-PCR auf die Expression von CD52 bzw. IPL analysiert (Tabelle 4). CD52 wird von

Lymphozyten ausgeprägt, KMH2-Zellen sind positiv für IPL, aber negativ für CD52. Alle analysierten Zellgruppen von 5-50 Zellen waren CD52 bzw. IPL-positiv. Sogar in 5/10 einzelnen KMH2-Zellen und 4/6 einzelnen T-Zellen konnte die Expression von IPL bzw. CD52 nachgewiesen werden. Die Effizienzen des etablierten RT-PCR-Protokolls erwiesen sich als sehr gut und wurde unter 3.2 angewandt, um die Expression verschiedener HRS-Zell-spezifischer Gene in primären lasermikrodissektierten HRS- und L&H-Zellen zu analysieren.

Tabelle 4: RT-PCR-Effizienzen lasermikrodissektierter Zellen

	analysierte Expression	positive Proben/analysierte Proben				
		Zellen pro Probe				
		1	5	10	25	50
Zelltyp						
KMH2	IPL	5/10	6/6	6/6	6/6	n.a.
T-Zellen	CD52	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Kontrollen						
Pufferkontrollen	IPL	0/4	0/2	0/2	0/2	n.a.
	CD52	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Je 6-10 Gruppen von 1, 5, 10, 25 und 50 T-Zellen bzw. KMH2 Zellen und je 2-4 Pufferkontrollen wurden für die Expression von CD52 bzw. IPL analysiert.(n.a., nicht analysiert).

3.1.3 Etablierung eines RNA-Amplifikationsprotokolls zur Verwendung von Affymetrix Microarrays

Die Etablierung des RNA-Amplifikationsprotokolls zur Verwendung von Affymetrix Microarrays war ein sehr komplexer und langandauernder Prozess, von dem hier nur die wichtigsten Experimente dargestellt werden können. Zu Beginn der Etablierung wurde von Frau Susan Eckerle (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) neben dem später verwendeten T7-RNA-Polymerase-basierenden RiboAmpTM Amplification Kit (Arcturus) zur linearen Amplifikation auch ein modifizierter PCR-basierter Kit, der SuperSMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech), getestet (siehe Kapitel 2.1.5). Der PCR-basierte Kit erwies sich als technisch schlecht durchführbar, führte nicht zu verlässlichen Ergebnissen und auch die Effizienzen der PCR waren nicht zufriedenstellend. Die weitere Etablierung wurde gemeinsam mit Frau Susan Eckerle durchgeführt und ist auch Teil ihrer Promotion. Die Etablierung des RNA-Amplifikationsprotokolls konzentrierte sich somit auf den T7-RNA-Polymerase-basierenden RiboAmpTM Amplification Kit (Arcturus) zur linearen Amplifikation.

3.1.3.1 Reproduzierbarkeit des Amplifikationsprotokolls

Zur Etablierung des 2-Runden-RNA-Amplifikationsprotokolls wurde der T7-RNA-Polymerase-basierende RiboAmp™ Amplification Kit (Arcturus) verwendet, mit dem die RNA linear amplifiziert wurde (siehe Kapitel 2.1.5.2). Fünf ng Gesamt-RNA entsprechen ca. 500 FACS-sortierten Zellkulturzellen, die als ganze Zellen sortiert werden, bzw. ca. 1000 lasermikrodissektierten Zellen, die aus Gewebeschnitte oft nur als angeschnittene Zellen isoliert werden können. Aus Zellen der HL-Zelllinie L428 wurde RNA isoliert und in Aliquots von 5 ng RNA verdünnt. Zudem wurden auch 500 L428 Zellen FACS-sortiert und für das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll verwendet. Die Gesamt-RNA von 10^6 L428-Zellen wurde zum Vergleich für das Affymetrix-Standardprotokoll verwendet. Um die technische Reproduzierbarkeit des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls zu überprüfen, wurde die Gesamt-RNA von 10^6 L428-Zellen, 5 ng Gesamt-RNA sowie Gesamt-RNA aus 500 sortierten L428-Zellen in Duplikaten dem Affymetrix-Standardprotokoll bzw. dem 2-Runden-Amplifikationsprotokoll unterzogen und mittels der Affymetrix MAS 5.0 Software analysiert (Tabelle 5). Die Signal-Korrelationen (R^2) der einzelnen Duplikate des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls sowie die Anzahl der diskrepanten „Calls“ (*Probe sets*, die in einem Replikat als „Present“ und im anderen als „Absent“ gewertet werden und somit „falsch positive“ *Probe sets* anzeigen) liegt im Rahmen der Richtwerte, die für das Standardprotokoll angegeben werden. Die Anzahl der *Probe sets*, die eine 2-fach Hoch- bzw. Runterregulation zeigen, ist höher als die Richtwerte für das Affymetrix-Standardprotokoll, allerdings ist auch der Wert für die Replikate für die 10^6 L428-Zellen des Standardprotokolls höher. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll gut reproduzierbar ist.

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit des Amplifikationsprotokolls

Experiment	Signal-Korrelation R^2	% $-2 \leq FC \leq 2$	% diskrepante „Calls“ (Absent vs Present)
Array-Typ: U95Av2			
L428			
500 Zellen vs 500 Zellen	0,971	5,22	8,81
5 ng Gesamt-RNA vs 5 ng Gesamt-RNA	0,969	5,88	7,44
500 Zellen vs 5 ng Gesamt-RNA	0,933 – 0,95	5,41 – 10,74	10,57
Std (1×10^6) vs Std	0,904	10,57	9,65
Affymetrix technote Std	min. 0,95	max. 2	max. 10

Duplikate von 500 sortierten L428 Zellen und 5 ng Gesamt-RNA von L428-Zellen wurden mittels des Amplifikationsprotokolls prozessiert, Gesamt-RNA von 10^6 L428-Zellen wurden zum Vergleich mittels des Affymetrix-Standardprotokolls prozessiert. Zudem sind in der Tabelle die Richtwerte, die die Firma Affymetrix für das Standardprotokoll (Std) angibt, dargestellt (Affymetrix technote Std). Die diskrepanten „Calls“ zeigen den Anteil der „falsch positiven“ Ergebnisse an.

3.1.3.2 Reproduzierbarkeit der modifizierten ENZO-Labeling-Reaktion

Aufgrund erheblicher Probleme mit Qualitätsunterschieden der ENZO BioArray™ High-Yield™ RNA Transcript Labeling Kits (im Weiteren als ENZO Kits bezeichnet) wurden verschiedene Modifikationen getestet, um wieder verlässliche Ergebnisse zu erzielen: (1) die ENZO-T7-Polymerase wurde durch verschiedene andere T7-Polymerasen ersetzt (Roche, Stratagene, Ambion), (2) die Menge der eingesetzten T7-Polymerase wurde erhöht (100 U vs 300 U), (3) die Inkubationszeit wurde verlängert (8 Stunden vs 4,5 Stunden), (4) statt der gesamten cDNA wurden nur 100 ng cDNA eingesetzt und (5) statt des Biometra Cyclers (Proben werden mit Öl überschichtet) wurde ein MJ Research Cycler mit Heizdeckel verwendet (Daten nicht gezeigt). Aus diesen verschiedenen Kombinationen hat sich folgende Kombination als die Beste erwiesen: die modifizierte ENZO-Reaktion wird mit 300 ng Stratagene T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Es werden 100 ng cDNA in die Reaktion eingesetzt und für 8 Stunden inkubiert. Es wird der MJ Research Cycler mit Heizdeckel verwendet, bei dem keine Überschichtung der Proben mit Öl notwendig ist.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der modifizierten ENZO-Labeling-Reaktion im Vergleich zum nicht-modifizierten Standard-ENZO-Protokolls zu überprüfen, wurden 5 ng Gesamt-RNA von L428-Zellen und Gesamt-RNA von 500 sortierten L428-Zellen dem modifizierten ENZO-Protokoll unterzogen und mit den entsprechenden Arrays des Standard-ENZO-Protokolls verglichen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der modifizierten ENZO-Labeling-Reaktion

Experiment	% „Present Calls“ (%P)	Signal-Korrelation R^2	% $-2 \leq FC \leq 2$	% diskrepante „Calls“ (Absent vs Present)
Array type: U95Av2				
modifiziertes ENZO-Protokoll				
modifiziertes ENZO 500 L428 Zellen \	39,9	0,947	12,19	9,77
Standard-ENZO 500 L428 Zellen	35,7			
modifiziertes ENZO vs.	39,9	0,959	10,04	8,13
5 ng Gesamt-RNA L428	41,7			
Standard-ENZO-Protokoll				
500 Zellen vs		0,971	5,22	8,81
500 Zellen				
5 ng Gesamt-RNA vs		0,969	5,88	7,44
5 ng Gesamt-RNA				
500 Zellen vs		0,933 – 0,95	5,41 – 10,74	10,57
5 ng Gesamt-RNA				

500 sortierte L428-Zellen und 5 ng Gesamt-RNA von L428-Zellen wurden mittels der modifizierten ENZO-Labeling-Reaktion prozessiert und mit den Arrays des Standard-ENZO-Protokolls verglichen. Im unteren Teil der Tabelle sind zum Vergleich nochmals die Werte des Standard-ENZO-Protokolls (vgl. Tabelle 5) angegeben.

Anhand der Signal-Korrelationen, diskrepanten „Calls“ und *probe sets* mit mehr als 2-facher Hoch- oder Runterregulation zwischen den zu vergleichenden Protokollen waren

keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Standard-ENZO-Protokoll erkennbar, so dass das modifizierte ENZO-Protokoll für alle weiteren Experimente verwendet wurde.

3.1.3.3 Anwendbarkeit des Amplifikationsprotokolls auf lasermikrodissektierte Zellen

Um zu testen, ob das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll ebenfalls auf lasermikrodissektierte Zellen aus H&E-gefärbten Gewebeschnitten reproduzierbar anwendbar ist, wurden Replikate von 500 mittels FACS sortierter L428-Zellen und ca. 1000 lasermikrodissektierte Zellen eines Burkitt-like-Lymphoms mit guter RNA-Qualität mittels des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls bzw. 10^6 L428 und 10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen mittels des Affymetrix-Standardprotokolls amplifiziert (Tabelle 7). Die Werte für die Signal-Korrelationen, diskrepanten „Calls“ und *Probe sets* mit mehr als 2- bzw. 5-facher Hoch- oder Runterregulation zwischen den Replikaten sind für die lasermikrodissektierten Zellen marginal schlechter. Die % *Present Calls* der lasermikrodissektierten Zellen sind geringer als die der L428-Zellen. Dies scheint nur zum Teil darin begründet zu sein, dass es sich um zwei unterschiedliche Zelltypen handelt, denn im Standardprotokoll sind die % *Present Calls* des Burkitt-like-Lymphoms nur geringfügig schlechter als die der L428-Zellen. Wahrscheinlicher ist, dass die gefärbten und lasermikrodissektierten Zellen eine etwas schlechtere RNA-Qualität aufweisen als die FACS-sortierten Zellen, wodurch es zum Verlust von Signalen für weiter 5'-gelegene *Probe sets* kommen kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll annähernd gleichwertig auch auf lasermikrodissektierte Zellen verlässlich und reproduzierbar anwendbar ist. Es könnte jedoch zum Verlust einiger Signale kommen.

Tabelle 7: Anwendbarkeit des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls auf lasermikrodissektierte Zellen

Experiment	% Present „Calls“	Signal-Korrelation R^2	% $-2 \leq FC \leq 2$	% $FC \geq 5$ oder $FC \leq -5$	% diskrepante „Calls“ (Absent vs Present)
Array-Type: U133A					
Burkitt-like-Lymphom					
1000 LPC Zellen vs 1000 LPC Zellen	32,2 28,5	0.981	2,99	0,415	11,11
500 L428 vs 500 L428	36,1 38,1	0,981	2,25	0,11	8,0
Std (1×10^6) vs Std (1×10^6)	47,1 45,9	0.988	1,26	0,23	7,19
Std L428 (1×10^6) vs Std L428 (1×10^6)	47,6 47,6	0,992	0,35	0,066	5,74

Replikate von 500 FACS-sortierten L428-Zellen und ca. 1000 lasermikrodissektierte Zellen eines Burkitt-like-Lymphoms mit guter RNA-Qualität wurden mittels des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls bzw. 10^6 L428 und 10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen mittels des Affymetrix-Standardprotokolls amplifiziert.

3.1.3.4 Verlässlichkeit des Amplifikationsprotokolls im Vergleich zum Standardprotokoll

Schließlich musste noch geklärt werden, ob das Muster der differentiell ausgeprägten Gene zweier Zelltypen zwischen dem Affymetrix-Standardprotokoll und dem 2-Runden-Amplifikationsprotokoll erhalten bleibt. Das Amplifikations- und das Standardprotokoll sind aufgrund der Verkürzung der RNA-Transkripte während der IVT methodisch so unterschiedlich, dass z.B. der Pearson-Korrelationskoeffizient zweier identischer Proben, die zum einen mittels des Amplifikationsprotokolls und zum anderen mittels des Standardprotokolls prozessiert wurden, schlechter als 0,9 ist und somit die Qualitätskriterien nicht erfüllt. In Clusteranalysen zeigt sich zudem, dass die Proben nicht anhand ihrer biologischen Entität, sondern anhand des Protokolls clustern, mit dem sie prozessiert wurden. Der direkte Vergleich zwischen Standard- und Amplifikationsprotokoll ist somit methodisch und technisch nicht zulässig. Daher werden die Listen der differentiell ausgeprägten Gene zweier Zelltypen zwischen Standard- und Amplifikationsprotokoll verglichen (Abb. 11 und Tabelle 8).

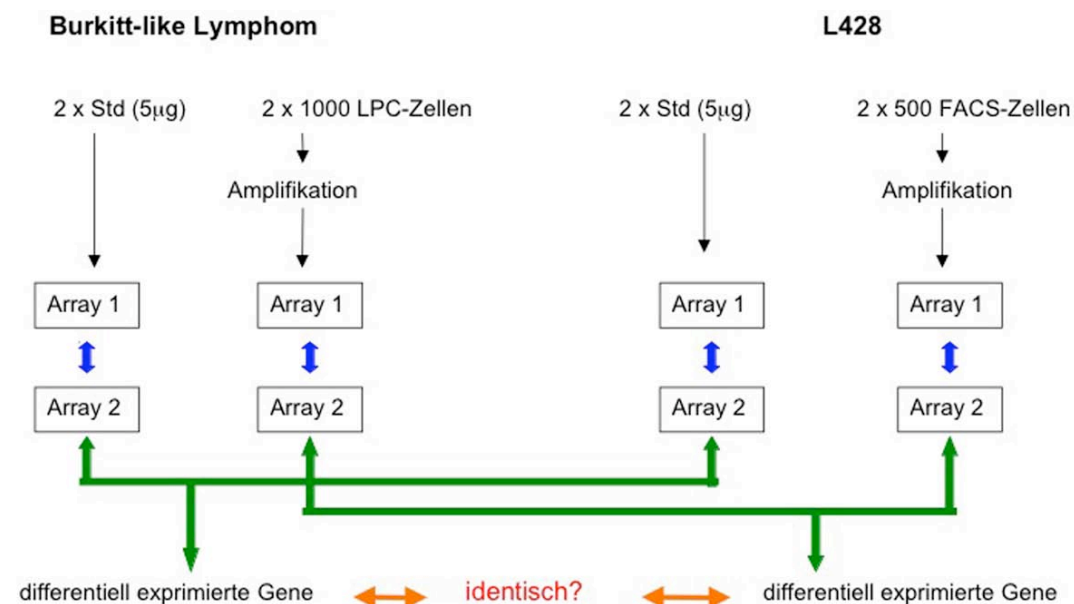


Abbildung 11: Schematische Übersicht des Experiments zur Analyse der Verlässlichkeit des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls im Vergleich zum Affymetrix-Standardprotokoll

Je zwei Replikate 1000 lasermikrodissektierter Burkitt-like-Lymphomzellen und 500 FACS-sortierter L428-Zellen wurden mittels des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls bzw. je 2×10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen und L428-Zellen wurden mittels des Affymetrix-Standardprotokolls prozessiert. Es wurden mehr Zellen mikrodisektiert als FACS-sortiert, da Gewebeschnitte oft nur Teile der Lymphomzellen enthalten, wohingegen ganze Zellen mittels FACS sortiert wurden. Die Reproduzierbarkeit beider Replikate wurden verglichen (blaue Pfeile). Die Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 10^6 L428- und 10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen (Affymetrix-Standardprotokoll; grüne Pfeile) wurde mit der Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 500 L428 und 1000 Burkitt-like-Lymphomzellen (2-Runden-Amplifikationsprotokoll; grüne Pfeile) verglichen (orange Pfeile).

Die Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 10^6 L428 und 10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen (Affymetrix-Standardprotokoll) wurde mit der Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 500 L428- und 1000 Burkitt-like-Lymphomzellen (2-Runden-Amplifikationsprotokoll) verglichen und die Schnittmenge beider Vergleiche ermittelt (Tabelle 8). So kann zum einen die Zahl der Gene ermittelt werden, die durch das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll im Vergleich zum Standardprotokoll verloren gehen (Teil A der Tabelle), zum anderen kann die Zahl der „falsch positiven“ Gene im Amplifikationsprotokoll festgestellt werden (Teil B der Tabelle).

Amplifikationsmethoden bergen das Risiko, dass ursprüngliche Transkriptlevel verzerrt werden. Der Verlust der Signalstärke für *Probes*, die relativ weit 5' in der mRNA lokalisiert sind, ist eine charakteristische Eigenschaft aller linearen Amplifikationsmethoden. Die Verkürzung der cRNA-Fragmente ist hauptsächlich durch die ineffiziente Reverse Transkription und die Verwendung von *random* Hexamer Primern (siehe Abb. 7) bedingt, was zwangsläufig zum Verlust von Signalen für Zielsequenzen führt, die weiter 5' in der Gensequenz liegen. Auch in diesem Experiment ist der Anteil der Gene, die im Amplifikationsprotokoll im Vergleich zum Standardprotokoll nicht identifiziert werden (d.h. über die Informationen verloren gehen) relativ hoch. Da primäre HRS- und L&H-Zellen jedoch nicht in ausreichenden Mengen für das Standardprotokoll isoliert werden können, ist die Amplifikation die einzige Möglichkeit, diese Zellen zu analysieren. Es muss aber bei der Datenanalyse bedacht werden, dass zu vielen Genen keine Informationen über die Expression und Expressionsstärke vorliegen werden.

Der Anteil von 155 (ca. 25%) „falsch positiven“ Genen von 443 Genen mit einer mehr als 5-fachen Hoch- bzw. Runterregulation im Amplifikationsprotokoll ist auf den ersten Blick sehr hoch. Jedoch finden sich von den 115 „falsch positiven“ Genen 19 Gene (16,5%) im Standardprotokoll in der Liste der Gene mit einem FC von 4 wieder, 82 Gene (70,4%) mit einem FC von 2 und 95 Gene (81,7%) in der ungefilterten Liste des Standardprotokolls. Nur 20 Gene (4,5%) lassen sich in keiner der Listen wiederfinden und sind somit wirklich falsch positiv. Viele dieser Sequenzen weisen eine *s_at* oder *x_at* Affymetrix-Signatur auf. *s_at* Signaturen kennzeichnen Splicevarianten, *x_at* Signaturen kennzeichnen Oligonukleotid-Sequenzen, durch die mehr als ein Gen erkannt werden. Die restlichen 95 Gene sind differentiell ausgeprägt, jedoch ist der FC nicht zwischen Amplifikations- und Standardprotokoll konserviert (die Regulation geht allerdings in die gleiche Richtung, d.h. hochregulierte Gene im Standardprotokoll zeigen auch im Amplifikationsprotokoll eine Hochregulation. Dies ist ebenso für runterregulierte Gene der Fall). Es scheint, dass die Höhe der Hoch- bzw. Runterregulation im Amplifikationsprotokoll eher niedriger erscheint, als sie in Realität ist, denn das Standardprotokoll wird als Maßstab angesehen. Durch die Verwendung statistischer Tests (t-Test, FDR) und stringenterer Filterung der Listen sollte die Rate der falsch positiven Gene reduziert werden können.

FC (+ / -) Kriterium	Burkitt-like Std vs L428 Std	Burkitt-like Ampl. vs L428 Ampl.	Schnittmenge beider Vergleiche
	differentiell ausgeprägte Gene	differentiell ausgeprägte Gene	differentiell ausgeprägte Gene
ohne	4269	2298	1607
	Δ 2662 fehlende Gene		
2	2398	1483	989
5	797	443	328

FC (+ / -) Kriterium	Burkitt-like Std vs L428 Std	Burkitt-like Ampl. vs L428 Ampl.	Schnittmenge beider Vergleiche
	differentiell ausgeprägte Gene	differentiell ausgeprägte Gene	differentiell ausgeprägte Gene
ohne	4269	2298	1607
2	2398	1483	989
5	797	443	328

Δ 115 „falsch positiv“
 FC 4: 19 (16,5%)
 82 (70,4%)
 95 (81,7%)

Tabelle 8: Analyse der Verlässlichkeit des 2-Runden-Amplifikationsprotokolls im Vergleich zum Affymetrix-Standardprotokoll

Je zwei Replikate 1000 lasermikrodissektierter Burkitt-like-Lymphomzellen und 500 FACS-sortierter L428 Zellen wurden mittels des 2-Runden Amplifikationsprotokolls (Ampl.) bzw. je 2×10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen und L428 Zellen wurden mittels des Affymetrix-Standardprotokolls (Std.) prozessiert. Die Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 10^6 L428 und 10^6 Burkitt-like-Lymphomzellen (Affymetrix-Standardprotokoll) wurde mit der Liste der differentiell ausgeprägten Gene zwischen 500 L428 und 1000 Burkitt-like-Lymphomzellen (2-Runden Amplifikationsprotokoll) verglichen und die Schnittmenge beider Vergleiche ermittelt.

(a) Darstellung der Gene, die durch das 2-Runden-Amplifikationsprotokoll im Vergleich zum Standardprotokoll verloren gehen als Folge der Verkürzung der cRNA-Transkripte aufgrund ineffizienter Reversen Transkription und der Verwendung von *random* Hexamer Primern (siehe Abb. 7). Dies führt zwangsläufig zum Verlust von Signalen für Zielsequenzen, die weiter 5' der Gensequenz liegen.

(b) Darstellung der „falsch positiven“ Gene im Amplifikationsprotokoll. Von den 115 „falsch positiven“ Genen finden sich 19 Gene (16,5%) im Standardprotokoll in der Liste der Gene mit einem FC von 4 wieder, 82 Gene (70,4%) mit einem FC von 2 und 95 Gene (81,7%) in der ungefilterten Liste des Standardprotokolls. Nur 20 Gene (4,5%) lassen sich in keiner der Listen wieder finden und sind somit wirklich falsch positiv.

3.2 RT-PCR-Analysen lasermikrodissektierter primärer HRS-Zellen für HRS-Zell-spezifische Gene

Die in 3.1 etablierten Methoden zur RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR – alle ausgehend von geringen Zellmengen – wurden in verschiedenen Analysen angewandt, um die Expression einzelner in Affymetrix-Microarray- und SAGE-Analysen (von cHL Zelllinien) identifizierter HRS-Zell-spezifischer Gene (PRAME, IPL, FER, RAB13, EAR3, RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT}) in lasermikrodissektierten primären HRS-Zellen zu validieren (Küppers et al., 2003; Schwering et al., 2003b; Willenbrock et al., 2006).

Einzelne lasermikrodissektierte HRS-Zellen wurden jeweils in Gruppen von 25-50 Zellen mittels RT-PCR analysiert. Je drei Gruppen von HRS-Zellen wurden pro Gen und Fall untersucht. Parallel wurden Gruppen von non-HRS-Zellen (hauptsächlich Lymphozyten) aus denselben Gewebeschnitten wie die HRS-Zellen, Pufferkontrollen und Positivkontrollen analysiert. Für alle acht untersuchten Transkripte zeigten alle oder zumindest die Mehrheit der analysierten Proben Expression in primären HRS-Zellen (Tabelle 9, (Schwering et al., 2003b) Tabelle 10, (Küppers et al., 2003); und (Willenbrock et al., 2006)).

Tabelle 9: RT-PCR-Analyse lasermikrodissektierter primärer HRS-Zellen für die Gene RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT} (Schwering et al., 2003b)

Fälle	positive Proben/ analysierte Proben		
	RhoC	ATBF1	p21 ^{SNFT}
cHL			
1	3/3	3/3	3/3
2	3/3	3/3	2/3
3	3/3	3/3	3/3
4	3/3	3/3	2/3
Kontrollen			
Positivkontrollen (KMH2)	6/6	5/5	5/6
non-HRS-Zellen 1-4	3/19	1/12	0/12
GC-B-Zellen	0/6	0/6	0/6
Pufferkontrollen 1-4	0/14	0/12	1/12

Gruppen von 50 HRS-Zellen bzw. non-HRS-Zellen (kleine non-HRS-Zellen aus denselben Gewebeschnitten) wurden mittels RT-PCR analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Gruppen von 50 GC-B-Zellen analysiert. Dass die RNA-Qualität der tonsillären Gewebeschnitte eine erfolgreiche RT-PCR erlaubte, wurde mit einer RT-PCR für CD52 überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Pufferkontrollen (Kontaminationskontrollen) enthielten keine Zellen. Als Positivkontrolle dienten 10 KM2-231-Zellen (FACS-sortiert). Die wenigen positiven non-HRS-Zellen könnten durch eine zelluläre Kontamination der Zellgruppen mit Fragmenten von HRS-Zellen oder durch reale Expression dieser Gene in einigen non-HRS-Zellen herrühren.

Tabelle 10: RT-PCR-Analyse lasermikrodissektierter primärer HRS-Zellen für die Gene PRAME, IPL, FER, RAB13 und EAR3 (Küppers et al., 2003)

Fälle	Subtyp	EBV Status	positive Proben/ analysiere Proben				
			PRAME	IPL	FER	RAB13	EAR3
cHL							
1	NS	-	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
2	MC	+	3/3	3/3	n.a.	n.a.	n.a.
3	NS	-	4/4	3/3	2/3	3/3	3/3
4	NS	+	2/4*	3/3	3/3	3/3	3/3
5	NS	-	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3
6	MC	+	0/3*	2/3	3/3	3/3	2/3
7	MC	-	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
NLPHL							
8	LP	-	1/2*	2/2	2/2	2/2	0/2
9	LP	-	2/2*	2/2	2/2	2/2	1/2
Kontrollen							
Positivkontrollen			15/16	11/12	13/13	10/10	11/13
non-HRS-Zellen 1-9			1/27	0/25	0/22	3/22	1/22
Pufferkontrollen 1-9			0/27	0/25	0/22	0/22	0/22

Gruppen von 25 oder 50 HRS-Zellen bzw. non-HRS-Zellen (kleine Zellen aus denselben Gewebeschnitten, aus denen die HRS-Zellen isoliert wurden) wurden mittels RT-PCR analysiert. Die wenigen positiven non-HRS-Zellen könnten durch eine zelluläre Kontamination der Zellgruppen mit Fragmenten von HRS-Zellen oder durch reale Expression dieser Gene in einigen non-HRS-Zellen herrühren. Die Pufferkontrollen (Kontaminationskontrollen) enthielten keine Zellen. Als Positivkontrolle der cDNA-Synthese und der RT-PCR dienten 10 KMH2-Zellen (FACS-sortiert). Die PCR für PRAME und IPL bestand aus einer Amplifikationsrunde mit 40 Zyklen, die anderen drei Gene wurden mit zwei Amplifikationsrunden mit je 20 bzw. 30 Zyklen analysiert. *In den Fällen 4, 8 und 9 zeigte eine der HRS-Zellgruppen erst nach zwei Amplifikationsrunden ein positives Ergebnis (die Kontrollzellen blieben bei denselben PCR-Bedingungen negativ). Die HRS-Zellgruppen des Falles 6 zeigten auch nach zwei Amplifikationsrunden keine PRAME-Expression. (n.a., nicht analysiert).

Es konnte kein Unterschied in der Expression zwischen EBV-positiven oder EBV-negativen cHL beobachtet werden. Die Kontrollgruppen der non-HRS-Zellen waren nahezu alle negativ (Tabelle 9, (Schwering et al., 2003b) und Tabelle 10, (Küppers et al., 2003); (Willenbrock et al., 2006)). Interessanterweise zeigten vier der untersuchten Gene (PRAME, RAB13, FER, IPL) ebenfalls Expression in L&H-Zellen der zwei untersuchten NLPHL (Tabelle 10, (Küppers et al., 2003)). Die Expression von PRAME, IPL, FER, RAB13, EAR3, RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT} konnte in primären HRS-Zellen validiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Affymetrix-Microarray- und SAGE-Analysen der cHL Zelllinien ein verlässliches Muster der Genexpression in primären HRS-Zellen widerspiegeln.

3.3 Genomweite Genexpressionsanalyse

Die pathogenen Mechanismen des nodulären lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms sind weitestgehend unbekannt. Dies lässt sich u.a. durch die technische Schwierigkeit erklären, die seltenen neoplastischen L&H-Zellen, die verstreut in einem zellulären Mikromilieu reichlicher nicht-neoplastischer Zellen liegen, zu analysieren. Mit der genomweiten Genexpressionsanalyse mikrodisektierter L&H-Zellen im Vergleich zu normalen und anderen malignen B-Zellen sollten folgende Fragen geklärt werden: (a) Definiert das Genexpressionsprofil von L&H-Zellen NLPHL als eine eigenständige Entität? (b) Was ist der histogenetische Ursprung der L&H-Zellen? (c) Welchen anderen malignen B-Zellen sind L&H-Zellen am ähnlichsten in Bezug auf ihre Genexpression? Unterstützt das Genexpressionsmuster von L&H- und HRS-Zellen aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten aber auch vieler Unterschiede, dass NLPHL und cHL zwei Untergruppen einer Krankheit sind, oder ist das NLPHL vielleicht enger mit anderen GC-B-Zell-Lymphomen verwandt, wie dem follikulären Lymphom? (d) Können L&H-Zell-spezifische Gene identifiziert werden, die in die Pathogenese des NLPHL involviert sein könnten und potentielle neue diagnostische Marker oder therapeutische Targets repräsentieren? (e) Welche Signalwege sind in L&H-Zellen aberrant aktiv, die deren Wachstum und Überleben fördern könnten?

3.3.1 Genomweite Genexpressionsanalysen isolierter L&H-Zellen definieren das NLPHL als eigene Entität, eng verwandt mit TCRBL, einer Untergruppe von DLBCL und cHL

Zur Genexpressionsanalyse wurden Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarrays verwendet, die ca. 47.000 humane Transkripte repräsentieren. Genexpressionsprofile wurden von mikrodisektierten L&H-Zellen von fünf NLPHL generiert und mit den Haupt-Subpopulationen normaler B-Zellen (CD77⁺ und CD77⁻ GC-B-Zellen, naive und Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen; je fünf Donoren) und Tumorzellen von B-NHL (fünf FL, fünf BL, elf DLBCL, vier TCRBL) und HRS-Zellen von 12 cHL verglichen. Das *Unsupervised hierarchical clustering* teilt die 67 Profile in zwei Hauptarme, die zum einen die malignen Lymphome und zum anderen die normalen B-Zellen beinhalten (Abb. 12). Unter den normalen B-Zellen teilen drei Hauptarme Plasmazellen von ruhenden peripheren Blutzellen (naive und Gedächtnis-B-Zellen) von GC-B-Zellen. Um die Verwandtschaft von L&H-Zellen zu anderen Lymphomen besser bestimmen zu können, wurde das *Unsupervised hierarchical clustering* auf die Tumorproben begrenzt (Abb. 13). FL und BL clustern separat voneinander in einem Arm des Dendrogramms, der auch die Mehrheit der DLBCL (6/11) und ein TCRBL enthält. NLPHL clustert in dem anderen Arm, nahe den meisten TCRBL (3/4), einigen DLBCL (3/11) und den cHL. Die L&H-Profile sind sich selbst ähnlicher als zu jedem anderen B-Zell-Lymphom, was impliziert, dass das NLPHL unter den analysierten B-Zell-Lymphomen eine eigene Entität repräsentiert. DLBCL bestehen aus

mehr als einer Subentität (Alizadeh et al., 2000; Monti et al., 2005) und bilden in diesem Cluster keinen eigenen Arm, sondern liegen vermischt mit allen Lymphomen.

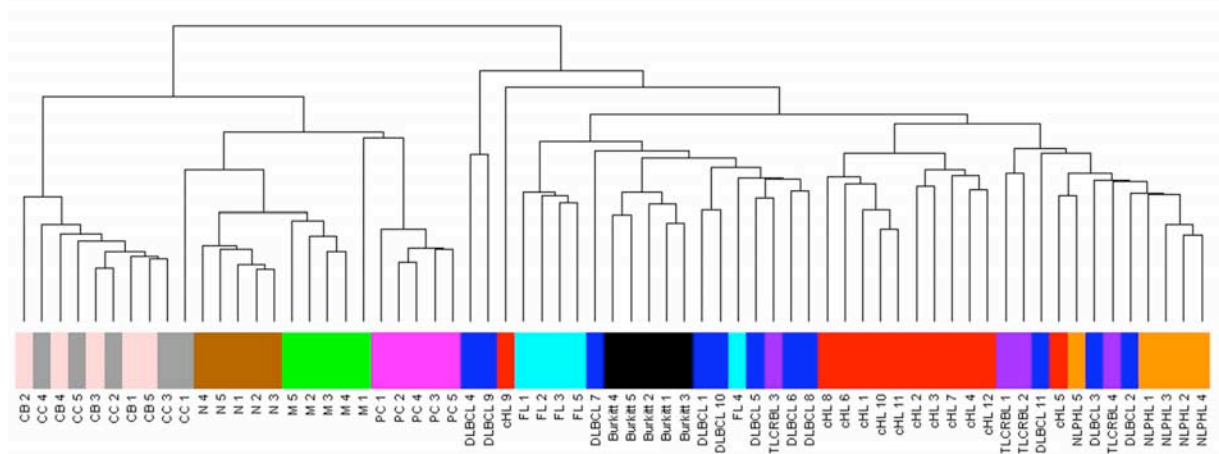


Abbildung 12: *Unsupervised hierarchical clustering* aller normaler und maligner Proben

Das Dendrogramm zeigt das *unsupervised hierarchical clustering* der Genexpressionsdaten normaler B-Zellsubpopulationen (5 N, 5 M, 5 CC, 5 CB, 5 PC), 5 NLPHL, 12 cHL und 25 B-NHL, basierend auf den 1294 am meisten variablen Genen (siehe Material & Methoden). Die verschiedenen Zelltypen sind farbcodiert: N, braun; M, grün; CC, grau; CB, rosa; PC, pink; NLPHL, orange; cHL, rot; FL, hellblau; BL, schwarz; DLBCL, dunkelblau; TCRBL, violett.

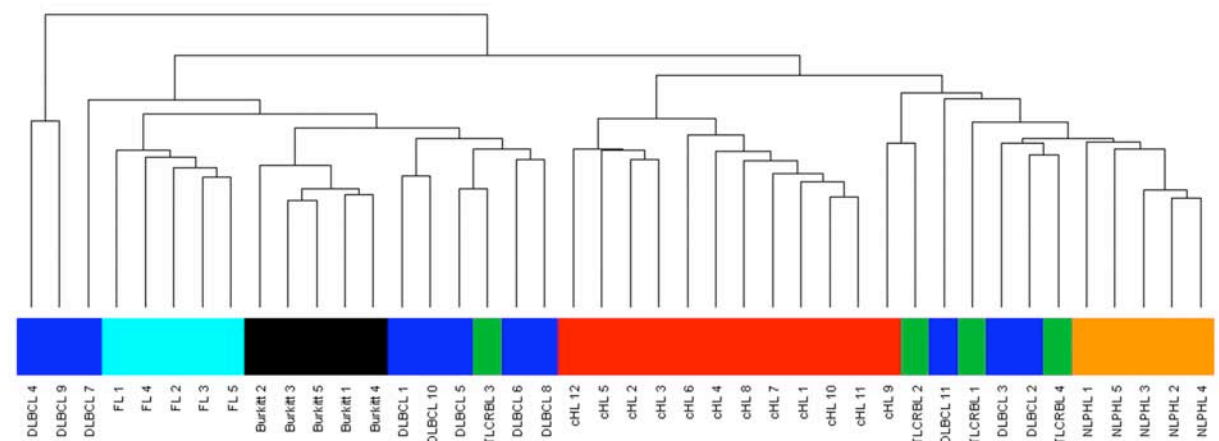


Abbildung 13: *Unsupervised hierarchical clustering* aller Lymphomproben

Das Dendrogramm zeigt das *unsupervised hierarchical clustering* der Genexpressionsdaten aller Lymphomproben, basierend auf den 582 am meisten variablen Genen (siehe Material & Methoden). Die verschiedenen Zelltypen sind farbcodiert: NLPHL, orange; cHL, rot; FL, hellblau; BL, schwarz; DLBCL, dunkelblau; TCRBL, grün.

Als nächstes wurde die Beziehung der L&H-Zellen zu den anderen Lymphomen mittels Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) der durchschnittlichen Expressionsvektoren untersucht (Abb. 14a). Dabei zeigte sich, dass das NLPHL eine größere Ähnlichkeit zu TCRBL und cHL aufweist als zu DLBCL, BL oder FL. Dies ist mit den Ergebnissen des *Unsupervised hierarchical clustering* (Abb. 12) in Einklang.

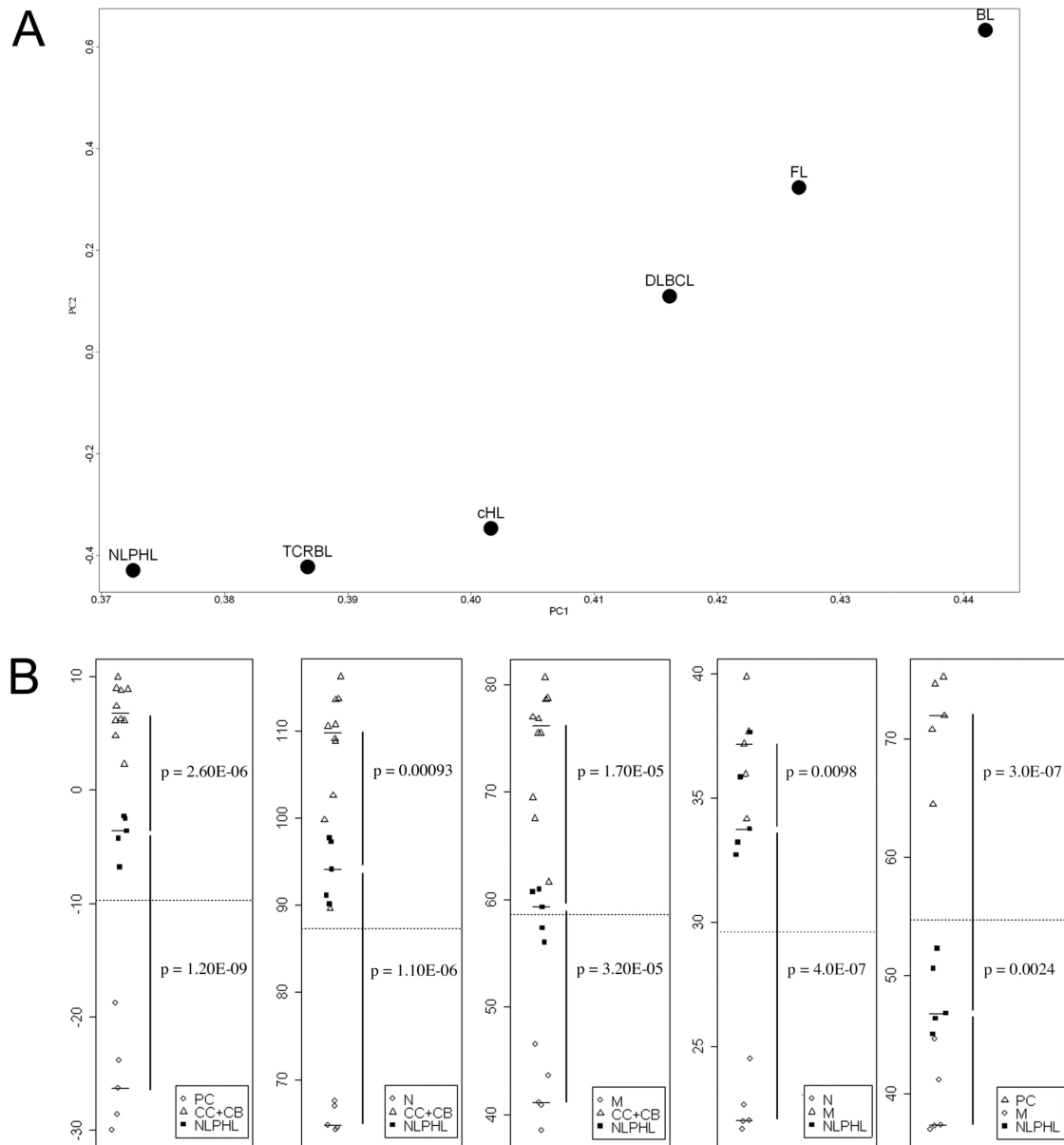


Abbildung 14: PCA der Verwandtschaft von L&H-Zellen mit anderen Lymphomen und mit normalen B-Zellen

(a) 3364 Gene, deren Expressionsmedian in mindestens einer Lymphomentität über dem Hintergrundwert lag, gingen in die PCA ein, um die Verwandtschaft der L&H-Zellen (Durchschnitt von 5 Proben) zu malignen B-Zellen anderer Lymphome (Durchschnitt von 4-12 Proben) zu ermitteln. Gezeigt sind die ersten zwei Hauptkomponenten, die 88,1% bzw. 5,5% der Gesamtvarianz berücksichtigen.

(b) Gene, die zwischen GC-B-Zellen (CC+CB) und naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen bzw. Plasmazellen ($FC \geq 4$; $FDR < 0,05$ nach t-Test; 229, 128 bzw. 130 *Probe sets*) und zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen ($FC \geq 2,5$; $FDR < 0,05$ nach t-Test; 47 *Probe sets*) sowie zwischen Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen ($FC \geq 4$; $FDR < 0,05$ nach t-Test; 135 *Probe sets*) unterscheiden, wurden in der PCA benutzt, um das engste normale Pendant der L&H-Zellen zu identifizieren. Die y-Achse zeigt den Hauptkomponentenwert, die horizontalen Linien zeigen den Median jeder Gruppe und die horizontalen gepunkteten Linien repräsentieren den Durchschnitt der Mediane der beiden zu vergleichenden normalen B-Zellsubpopulationen. Gezeigt sind auch die p-Werte (Wilcoxon-Test) der paarweisen Vergleiche (vertikale Linien) zwischen L&H-Zellen und den normalen B-Zellen. (Berücksichtigte Gesamtvarianz der ersten Hauptkomponente: GC-B-Zellen vs PC, 89%; GC-B-Zellen vs N, 93,9%; GC-B-Zellen vs M, 92,5%; M vs N, 86,6%; M vs PC, 92,8%)

3.3.2 Die enge Verwandtschaft von L&H- und HRS-Zellen bestätigt sich in *supervised* Analysen

In einem *supervised* Vergleich der Genexpressionsprofile von L&H- und HRS-Zellen waren nur 43 Gene statistisch signifikant (FDR nach t-Test 0,05) differentiell ausgeprägt ($FC \geq 1,8$) (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise unterschieden zwischen NLPHL und FL, die sich in vielen Aspekten ähneln, ca. 7-fach mehr (295) Gene, wenn die gleichen Filterkriterien verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

Da cHL in ihrer immunhistologischen Markerexpression sehr heterogen sind (Weiss et al., 2007), wurden weniger stringente Filterkriterien angewandt ($FDR < 0,1$). Unter diesen Filterbedingungen waren 129 Gene zwischen L&H- und HRS-Zellen differentiell ausgeprägt, sechs Gene waren in höherem Maß in HRS-Zellen exprimiert und 123 in höherem Maß in L&H-Zellen. Von drei der sechs im cHL hochregulierten Gene (die Chemokine *CCL22* (*MDC*) und *CCL17* (*TARC*) und Interleukin 6 (*IL6*)) ist bereits bekannt, dass sie in HRS-Zellen häufiger und/oder in höheren Maß als in L&H-Zellen ausgeprägt werden (Herbst et al., 1997; Maggio et al., 2002; Vermeer et al., 2002), was diese Analyse validiert. Hohe Expression des *Jun dimerization protein p21^{SNFT}* ist ebenso für HRS-Zellen bekannt (Schwering et al., 2003b). Andere bekannte zwischen HRS- und L&H-Zellen differentiell ausgeprägte Gene, z.B. *CD30* und *GATA3*, wurden in dieser Analyse nicht gefunden, da ihre mRNA Expressionslevel in den cHL-Fällen zu heterogen war, um die Filterkriterien zu erfüllen. Die meisten der 123 in L&H-Zellen hochregulierten Gene wurden in ähnlicher Höhe in GC-B-Zellen ausgeprägt, was zeigt, dass dies (GC) B-Zellmarker sind, die in HRS-Zellen runterreguliert sind. Folglich verbleiben nur 27 Gene, die in L&H-Zellen verglichen mit HRS und GC-B-Zellen hochreguliert sind (Tabelle 11). Die Hochregulation dieser Gene in L&H-Zellen verglichen mit HRS-Zellen ist meist nur moderat (2- bis 3-fach). Unter diesen Genen wurden KISS1 Rezeptor (*KISS1R*), das SLAM Familienmitglied 7 (*SLAMF7*), Protein Kinase C zeta und Serum/Glucocorticoid regulierte Kinase (*SGK*) identifiziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur erstaunlich wenige Gene konsistente Unterschiede in der Expression zwischen L&H- und HRS-Zellen zeigten.

Tabelle 11: Differentiell ausgeprägte Gene zwischen L&H- und HRS-Zellen

<i>Fold change</i> (FC)	<i>Gensymbol</i>	<i>Affymetrix set ID</i>	<i>Probe</i>	<i>Genname</i>
im cHL im Vergleich zum NPLHL hochregulierte Gene				
33,6	CCL22	207861_at		chemokine (c-c motif) ligand 22; MDC
15,6	CCL17	207900_at		chemokine (c-c motif) ligand 17; TARC
7,2	SNFT	220358_at		Jun dimerization protein p21SNFT
4,0	ODZ2	231867_at		odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila); teneurin-2
3,1	IL6	205207_at		interleukin 6 (interferon, beta 2)
2,3	MGST3	201403_s_at		microsomal glutathione S-transferase 3
im NPLHL im Vergleich zum cHL (und GC-B-Zellen) hochregulierte Gene				
4,9	KISS1R	242517_at		KISS1 receptor; GPR54
3,9	CHIT1	208168_s_at		chitinase 1 (chitotriosidase)
3,9 / 2,9	GBP1	231577_s_at		guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67 kDa
		202269_x_at		
3,8	SGK	201739_at		serum/glucocorticoid regulated kinase
3,2	CHI3L1	209396_s_at		chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
2,9	SLAMF7	222838_at		SLAM family member 7
2,9	GLA	214430_at		galactosidase, alpha
2,9	TSC22D1	215111_s_at		TSC22 domain family, member 1
2,8	STAT1	AFFX-HU-MISGF3A/M97935_3_at		signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa
2,8	EOMES	231776_at		eomesodermin homolog (Xenopus laevis)
2,8	ITM2A	202747_s_at		Integral membrane protein 2A
2,6	TMEM163	223503_at		transmembrane protein 163
2,6	ATP6V1A	201972_at		ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70 kDa, V1 subunit A
2,5	PLXNA1	221538_s_at		plexin A1
2,4	DRAM	218627_at		damage-regulated autophagy modulator
2,4	DUSP2	204794_at		dual specific phosphatase 2; PAC1
2,4	PLEK	203471_s_at		pleckstrin
2,3	CKS2	204170_s_at		CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
2,3	PRKCZ	202178_at		protein kinase C, zeta
2,3	LIMS1	212687_at		LIM and senescent cell antigen-like domains 1
2,2	F11R	223000_s_at		F11 receptor
2,2	SLC31A1	203971_at		solute carrier family 31 (copper transporters), member 1
2,1	CTSH	202295_s_at		cathepsin H
2,1	BID	211725_s_at		BH3 interacting domain death agonist
2,1	NOD27	226474_at		nucleotide-binding oligomerization domains 27
1,8	RAB27A	210951_x_at		RAB27A, member RAS oncogene family
1,8	PSMB8	209040_s_at		proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)

129 Gene sind zwischen L&H- und HRS-Zellen differentiell ausgeprägt, wenn man ≥ 1.8 als FC cut-off und t-Test p-Wert < 0.05 /FDR < 0.1 als statistischen cut-off wählt. Von den 123 Genen, die in höherem Maße in L&H-Zellen verglichen mit HRS-Zellen ausgeprägt sind, sind nur 27 auch im Vergleich zu GC-B-Zellen hochreguliert und in dieser Tabelle gezeigt. Die verbleibenden 96 Gene, die in HRS-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen runterreguliert sind, sind nicht gezeigt.

3.3.3 Nur wenige Gene unterscheiden L&H-Zellen von den Lymphomzellen des TCRBL

Der *supervised* Vergleich von L&H-Zellen und den Tumorzellen des TCRBL, einer hochheterogenen Entität (Lim et al., 2002), ergab 42 konsistent differentiell ausgeprägte Gene ($FC \geq 1,8$; t-Test p-Wert $< 0,05$ /FDR $< 0,2$) (Abb. 15 und Tabelle 12). Alle 42 Gene zeigten erhöhte Expression in L&H-Zellen verglichen zu den Tumorzellen des TCRBL und beinhalten: autotaxin (*ENPP2*), das Proto-Onkogen cortactin (*CTTN*) und Alpha Kinase 2 (*ALPK2*).

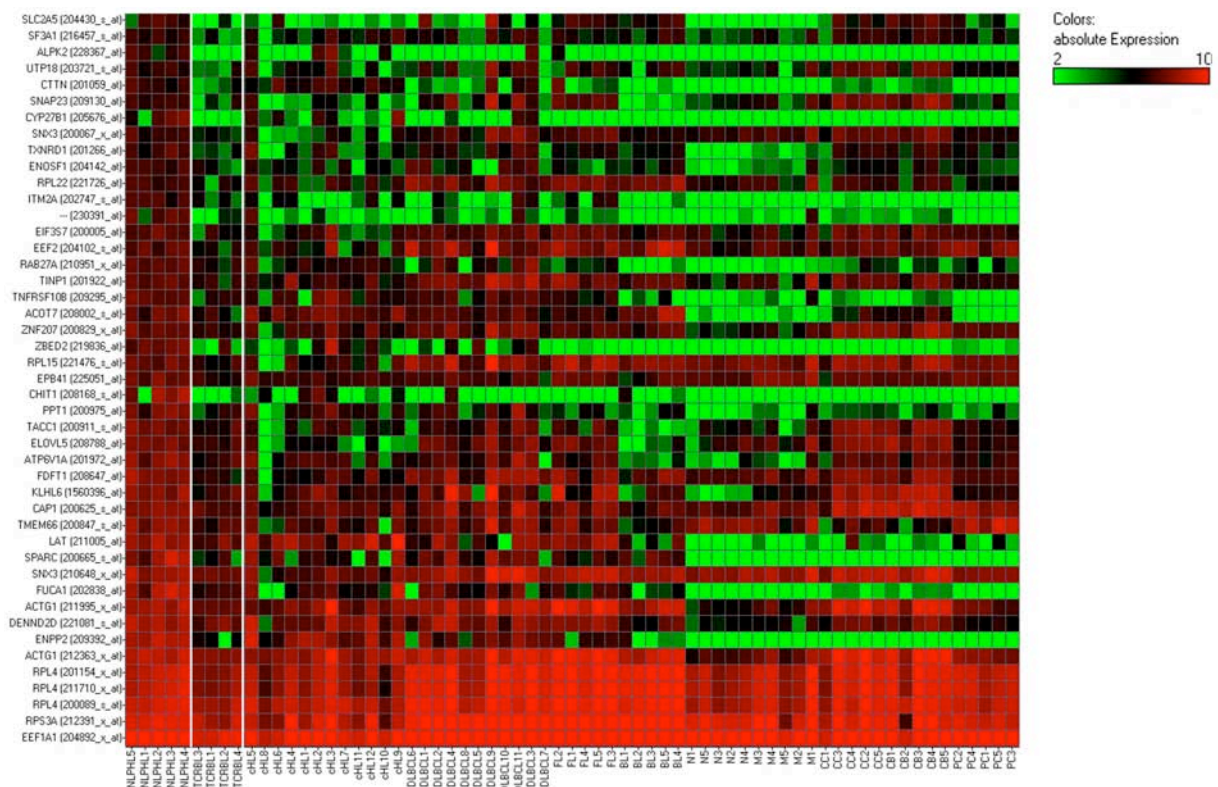


Abbildung 15: Differentiell ausgeprägte Gene zwischen L&H-Zellen und den Tumorzellen des TCRBL

Die Expressionswerte der 42 zwischen L&H-Zellen und den Tumorzellen des TCRBL sind in einer *Heatmap* dargestellt. Spalten repräsentieren individuelle Fälle, Zeilen entsprechen den verschiedenen dargestellten Genen. Die absoluten Expressionswerte sind in einer logarithmischen Scala zur Basis 2 farbcodiert. Die Profile der anderen Lymphome und normalen B-Zellsubpopulationen sind zum Vergleich gezeigt.

Tabelle 12: Differentiell ausgeprägte Gene zwischen L&H-Zellen und den Tumorzellen des TCRBL

<i>Fold change</i> (FC)	Gensymbol	Affymetrix <i>Probe set ID</i>	Genname
7,0	CHIT1	208168_s_at	chitinase 1 (chitotriosidase)
6,8	ENPP2	209392_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)
5,8	ALPK2	228367_at	alpha-kinase 2
4,7	CYP27B1	205676_at	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
4,4	SPARC	200665_s_at	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
4,0	ZBED2	219836_at	zinc finger, BED-type containing 2
3,2	FUCA1	202838_at	fucosidase, alpha-L- 1, tissue
3,1	---	230391_at	nicht annotiert
3,0	FDFT1	208647_at	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
2,8	SLC2A5	204430_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member
2,4	PPT1	200975_at	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
2,3	ATP6V1A	201972_at	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A
2,3	ACOT7	208002_s_at	acyl-CoA thioesterase 7
2,2/2,1/1,8	RLP4	211710_x_at	ribosomal protein L4
		201154_x_at	
		200089_s_at	
2,2/1,9	ACTG1	211995_x_at	actin, gamma 1
		212363_x_at	
2,2	KLHL6	1560396_at	kelch-like 6 (Drosophila)
2,2	CTTN	201059_at	cortactin
2,1	DENND2D	221081_s_at	DENN/MADD domain containing 2D
2,1	TMEM66	200847_s_at	transmembrane protein 66
2,1	ITM2A	202747_s_at	integral membrane protein 2A
2,1	EEF2	204102_s_at	eukaryotic translation elongation factor 2
2,1	SF3A1	216457_s_at	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa
2,1	TXNRD1	201266_at	thioredoxin reductase 1
2,0	TACC1	200911_s_at	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
2,0	EIF3S7	200005_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 zeta, 66/67kDa
2,0	LAT	211005_at	linker for activation of T cells
2,0	TNFRSF10B	209295_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)
2,0	SNAP23	209130_at	synaptosomal-associated protein, 23kDa
1,9	ENOSF1	204142_at	enolase superfamily member 1
1,9	RLP15	221476_s_at	ribosomal protein L15
1,9	EEF1A1	204892_x_at	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
1,9	UTP18	203721_s_at	UTP18, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)
1,9	EPB41	225051_at	erythrocyte membrane protein band 4,1 (elliptocytosis 1, RH-linked)
1,9	RPS3A	212391_x_at	ribosomal protein S3A
1,9	RAB27A	210951_x_at	RAB27A, member RAS oncogene family
1,8	RLP22	221726_at	ribosomal protein L22
1,8/1,8	SNX3	200067_x_at	sorting nexin 3
		210648_x_at	
1,8	CAP1	200625_s_at	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
1,8	ELOVL5	208788_at	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)
1,8	TINP1	201922_at	TGF beta-inducible nuclear protein 1
1,8	ZNF207	200829_x_at	zinc finger protein 207

42 differentiell ausgeprägte Gene wurden im Vergleich von L&H-Zellen zu den Lymphomzellen des TCRBL identifiziert, nach Durchführung eines t-Test ($p \leq 0,05$) und Selektion aller *Probe sets* mit FDR unter 0,2 FC von mindestens 1,8-facher Hoch- oder Runterregulation,

3.3.4 Identifizierung L&H-Zell-spezifischer Gene

Um Gene zu identifizieren, die speziell in L&H-Zellen hoch- bzw. runterreguliert sind, wurden die NLPHL-Genexpressionsprofile mit denen der normalen B-Zellen und B-NHL verglichen. Die 12 cHL-Genexpressionsprofile wurden von der *supervised* Analyse ausgeschlossen, denn die hohe Ähnlichkeit zwischen NLPHL und cHL bezüglich der Genexpression hätte die Analyse beeinflusst, da die cHL-Profile ein Drittel aller Lymphomproben ausmachen.

In L&H-Zellen sind 49 Gene konsistent hochreguliert, fünf sind runterreguliert (Abb. 16 und Tabelle 13). Das Expressionsmuster einiger dieser 54 L&H-Zell-spezifischer Gene ist dem derselben TCRBL und DLBCL (TCRBL 1, 2, 4 und DLBCL 2, 3, 11) relativ ähnlich, die auch im *unsupervised hierarchical clustering* (Abb. 13) nahe den L&H-Profilen clustern. Dies ist konsistent mit den beschriebenen biologischen und phänotypischen Ähnlichkeiten dieser Lymphome. Bemerkenswert ist, dass keines der in L&H-Zellen hochregulierten Gene bisher für L&H-Zellen beschrieben wurde. Die hochregulierten Gene beinhalten den Transkriptionsfaktor *EOMES*, die Cathepsine *CTSB* und *CTSK*, die Matrix Metalloprotease *MMP12*, ein Mitglied der Tumorprotein Familie D52 (*TPD52L1*), ein Mitglied der Ras-Onkogen Familie (*RAS42*), das Proto-Onkogen *CTTN*, die Serin/Threonin Kinase *PRKCZ*, das vaskuläre Zell-Adhesionsmolekül *VCAM1*, den KISS1 Rezeptor und den *insulin-like growth factor 2 receptor IGF2R*. Die fünf in L&H-Zellen runterregulierten Gene repräsentieren B-Zell-spezifische Gene (Tabelle 13).

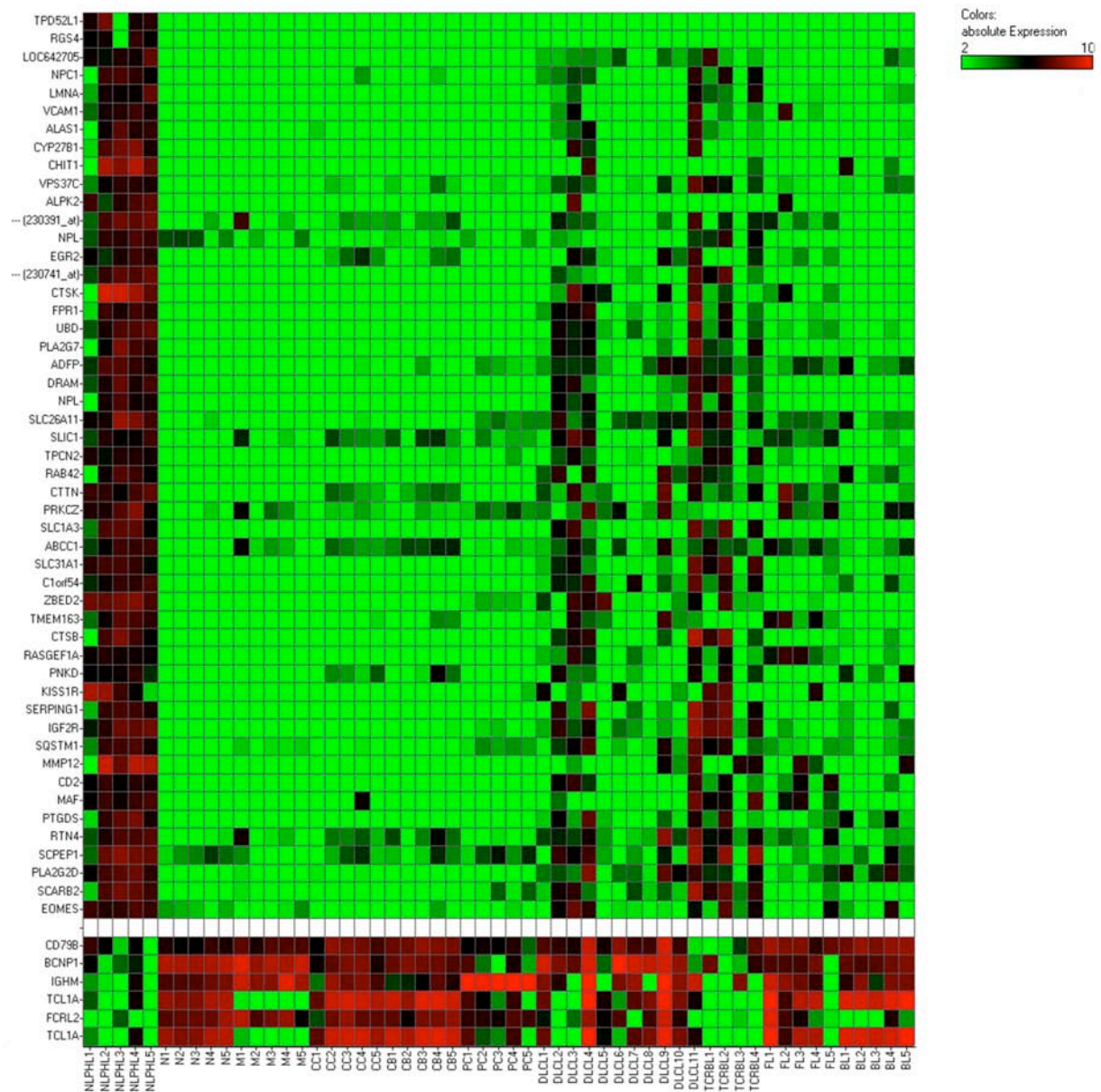


Abbildung 16: L&H-Zell-spezifische Gene

Die Expressionswerte der in L&H-Zellen verglichen mit allen anderen normalen und neoplastischen Proben (ausgenommen cHL) differenziell ausgeprägten Gene sind in einer *Heatmap* dargestellt. Spalten repräsentieren individuelle Fälle, Zeilen entsprechen den verschiedenen dargestellten L&H-Zell-spezifischen Genen. Die absoluten Expressionswerte sind in einer logarithmischen Scala zur Basis 2 farbcodiert. Die zwischen L&H-Zellen und normalen B-Zellen (N, M, GC-B-Zellen, PC) und B-NHL (FL, BL, DLBCL, TCRBL) differenziell ausgeprägten Gene wurden stringent vorgefiltert. In L&H-Zellen hochregulierte Gene mussten über Hintergrundniveau in mindestens vier von fünf NPLHL-Profilen und in nicht mehr als sechs von 50 normalen und malignen B-Zell-Profilen ausgeprägt sein. Es wurden 49 spezifisch in L&H-Zellen hoch ausgeprägte Gene identifiziert, die mindestens eine 2-fache Hochregulation in L&H-Zellen und einen signifikanten p-Wert von $<0,05$ (t-Test) aufwiesen. In L&H-Zellen runterregulierte Gene mussten über Hintergrundniveau in nicht mehr als einem von fünf NPLHL-Profilen und in mindestens 33 der normalen und malignen B-Zell-Profilen ausgeprägt sein. Es wurden fünf spezifisch in L&H-Zellen runterregulierte Gene identifiziert, die mindestens eine 2-fache Runterregulation in L&H-Zellen und einen signifikanten p-Wert von $<0,05$ (t-Test) aufwiesen.

Tabelle 13: L&H-Zell-spezifische Gene

<i>Fold change</i> (FC)	Gensymbol	Affymetrix <i>Probe set ID</i>	Genfunktion
im NLPHL im Vergleich zu normalen B-Zellen und B-NHL hochregulierte Gene			
13,0	MMP12	204580_at	Matrix Metalloprotease; in ECM-Degradation, Metastasierung und Angiogenese involviert
9,8	CHIT1	208168_s_at	in ECM-Degradation und Tumordinvasion involviert
8,5	CTSK	202450_s_at	
7,6	CYP27B1	205676_at	
7,1	ZBED2	219836_at	
6,7	ALPK2	228367_at	
6,3	---	230741_at	in ERK-Aktivierung involviert; überexprimiert in verschiedenen Krebserkrankungen
6,2	KISS1R	242517_at	
5,5	RGS4	204337_at	Regulator der G-Protein-Signaltransduktion
5,0	TPD52L1	203786_s_at	Mitglied der Tumorprotein D52 Familie; in Zell-Proliferation and Calcium-Signaltransduktion involviert
4,6	PLA2G7	206214_at	könnte die Tumorgenese modulieren; hohe Level von UBD in Zellen führen zu erhöhtem mitotischem Nondisjunction und Chromosomeninstabilität
4,6	NPL	221210_s_at	
2,9	---	240449_at	
4,5	UBD	205890_s_at	
4,5	SLC1A3	202800_at	vermittelt Leukozyten-Endothel-Zell-Adhesion
4,3	VCAM1	203868_s_at	
4,2	MAF	206363_at	
4,0	CD2	205831_at	Onkogene; Transkriptionsfaktor; überexprimiert in Multiplen Myelomen
4,0	DRAM	218627_at	
3,8	---	230391_at	
3,8	TMEM163	223503_at	
3,7	CTSB	227961_at	involviert in ECM-Degradation und Apoptose; überexprimiert in verschiedenen Krebserkrankungen
3,5	SCARB2	224983_at	Komplement Komponente C1 Inhibitor
3,4	PTGDS	211663_x_at	
3,4	SERPING1	200986_at	
3,4	IGF2R	201392_s_at	
3,4	ALAS1	205633_s_at	involviert in Tumorzell-Überwachung
3,4	SLC31A1	203971_at	
3,3	RASGEF1A	230563_at	
3,3	SLC26A11	226679_at	
3,2	CTTN	201059_at	Onkogene; involviert in Tumorzell-Invasion und Metastasierung; überexprimiert in verschiedenen Krebserkrankungen
3,1	SCPEP1	218217_at	Transkriptionsfaktor, hoch homolog zu T-bet
3,0	EOMES	231776_at	
3,0	RAB42	1552846_s_at	
3,0	C1orf54	219506_at	
2,9	PLA2G2D	220423_at	Mitglied der RAS-Onkogen-Familie
2,9	LOC642705	228066_at	
2,9	NPC1	202679_at	
2,9	LMNA	203411_s_at	
2,9	EGR2	205249_at	Lamin-Proteine scheinen involviert in nukleärer Stabilität und Chromatinstruktur
2,9	FPR1	205119_s_at	Transkriptionsfaktor
2,7	PRKCZ	202178_at	scheint <i>Motility</i> , Wachstum und Angiogenese humaner Glioblastome zu vermitteln
2,7	TPCN2	229250_at	Serin/Threonin Kinase; involviert in Proliferation und Differenzierung; aktiviert NF-κB
2,6	ADFP	209122_at	involviert in Arzneimittel-Resistenz (<i>multi-drug resistance</i>)
2,5	SQSTM1	201471_s_at	
2,4	VPS37C	219053_s_at	
2,3	PNKD	233177_s_at	
2,3	RTN4	214629_x_at	
2,1	SLIC1	228869_at	
2,0	ABCC1	202804_at	

<i>Fold change</i> (FC)	Gensymbol	Affymetrix <i>Probe set ID</i>	Genfunktion
<i>im NLPHL im Vergleich zu normalen B-Zellen und B-NHL runterregulierte Gene</i>			
-2,3	CD79B	205297_s_at	B Linien-spezifisches Gen
-3,8	BCNP1	230983_at	B Linien-spezifisches Gen
-4,3	IGHM	209374_s_at	B Linien-spezifisches Gen
-4,0	TCL1A	39318_at	B Linien-spezifisches Gen
-4,0		209995_s_at	
-2,8	FCRL2	1563674_at	B Linien-spezifisches Gen

Die 49 spezifisch in L&H-Zellen im Vergleich zu normalen und anderen malignen B-Zellen hochregulierten Gene wurden anhand folgender Kriterien identifiziert: i) Expression über Hintergrundniveau in ≥ 4 von 5 L&H-Profilen und in ≤ 6 von 50 normalen oder anderen malignen B-Zell-Profilen; ii) ≥ 2 -fache Hochregulation in L&H-Zellen und t-Test p-Wert $\leq 0,05$. Die fünf spezifisch in L&H-Zellen im Vergleich zu normalen und anderen malignen B-Zellen runterregulierten Gene wurden anhand folgender Kriterien identifiziert: i) Expression über Hintergrundniveau in ≤ 1 von 5 L&H-Profilen und in ≥ 33 von 50 normalen oder anderen malignen B-Zell-Profilen; ii) ≥ 2 -fache Runterregulation in L&H-Zellen und t-Test p-Wert $\leq 0,05$. Die 12 cHL-Profile wurden von der Analyse ausgeschlossen, denn die hohe Ähnlichkeit zwischen NLPHL und cHL bezüglich der Genexpression hätte die Analyse beeinflusst, da die cHL Profile ein Drittel aller Lymphomproben ausmachen. Bekannte Genfunktionen sind angegeben.

3.3.5 L&H-Zellen zeigen eine ähnliche Verwandtschaft zu GC-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen

Um das ähnlichste Pendant der L&H-Zellen unter den normalen B-Zellen zu identifizieren, wurden PCA mit den Genen durchgeführt, die GC-B-Zellen von naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen bzw. Plasmazellen sowie Gedächtnis-B-Zellen von naiven B-Zellen bzw. Plasmazellen unterscheiden (Abb. 14b). Anhand dieser Expressionssignatur wurde untersucht, wie sich L&H-Zellen in der Ausprägung der Gene verhalten, die signifikant zwischen den verglichenen Paaren normaler B-Zellen unterscheiden. Im Vergleich der GC-B-Zellen zu naiven B-Zellen sowie zu Plasmazellen sind L&H-Zellen ähnlicher zu GC-B-Zellen. Vergleicht man jedoch L&H-Zellen zu GC-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen, zeigen die L&H-Zellen eine gleiche Ähnlichkeit zu beiden Zelltypen. Im Vergleich der Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen sind L&H-Zellen ähnlicher zu Gedächtnis-B-Zellen. Zusammen mit der viel höheren Ähnlichkeit der L&H-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen als zu naiven B-Zellen, deutet dies darauf hin, dass L&H-Zellen GC-B-Zellen im Differenzierungsübergang zu Gedächtnis-B-Zellen sind.

3.3.6 Vergleich von L&H-Zellen mit GC-B-Zellen

3.3.6.1 Differentiell ausgeprägte Gene

Um zu untersuchen, ob in L&H-Zellen Signalwege dereguliert sind, die das Wachstum und Überleben der L&H-Zellen fördern, wurden die Profile der L&H-Zellen mit denen ihres nicht-malignen Pendants verglichen. Für diese Analyse wurden GC-B-Zellen ausgewählt, obwohl die PCA (Abb. 14) auch auf eine Ähnlichkeit der L&H-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen hindeutete, da die übergreifenden Eigenschaften von L&H-Zellen (keimzentrumähnliches Wachstumsmuster, Expression von Schlüsselmolekülen von GC-B-Zellen, aktive/ongoing Hypermutation) einen GC-B-Zell-Ursprung stark unterstützen. Es wurden 963

differentiell ausgeprägte Gene identifiziert (558 hochreguliert, 405 runterreguliert in L&H-Zellen; Daten nicht gezeigt; $FDR \leq 0,05$ nach t-Test, $-1,8 \leq FC \leq 1,8$). Einige der hochregulierten Gene sind bereits für L&H-Zellen beschrieben, z.B. das Mitglied der RAS Familie *RAB13* (Küppers et al., 2003), Epstein-Barr Virus-induzierte Gen 3 (*EBI3*) (Niedobitek et al., 2002), das Tumornekrosefaktor-induzierte Protein 3 (*TNFAIP3;A20*) (Dürkop et al., 2003), *FYN* (Marafioti et al., 2004a), *CFLAR (c-Flip)* (Uherova et al., 2004), die Chemo-kinliganden *CXCL9 (MIG)* und *CXCL10 (IP10)* (Maggio et al., 2002) und der Transferrin Rezeptor (*TFRC; CD71*) (Dorreen et al., 1984) (Abb. 18 und 19 und Daten nicht gezeigt). Die anderen, bisher nicht beschriebenen, hochregulierten Gene beinhalten die B-Zell-Überlebensfaktoren *BAFF (TNFSF13B; 10,5-fach hochreguliert)* und *APRIL (TNFSF13; 4,5-fach hochreguliert)*, die Transkriptionsfaktoren *STAT1, STAT2 (signal transducer and activator of transcription 1 und 2; 17,7-/8,7-/6,4-fach bzw. 1,8-fach hochreguliert)* und *EOMES (4,1-fach hochreguliert)*. Ein direktes Zielgen von EOMES, Interleukin-2-Rezeptor Beta (*IL2RB; CD122*) (Intlekofer et al., 2005), ist ebenso 7,4-fach hochreguliert. Beta-2-Mikroglobulin (*B2M*), welches von STAT1 hochreguliert wird und Teil des MHC-I-Moleküls ist, ist 5-fach hochreguliert in L&H-Zellen. STAT1 kann die Entwicklung von Leukämien durch die Aufrechterhaltung hoher MHC-I-Expression fördern (Kovacic et al., 2006).

Unter den in L&H-Zellen hochregulierten Genen, sind einige, deren onkogenes Potential beschrieben ist, nämlich *FYN, SGK* und cortactin (*CTTN*) (alle ca. 3-fach hochreguliert). Die Protein-Tyrosin-Kinase FYN steht mit der Kontrolle von Zellwachstum in Verbindung. SGK, eine Serin-Threonin-Protein-Kinase, wirkt in Mamma-Karzinomen durch die Aktivierung von NF- κ B als Onkogen (Zhang et al., 2005). Cortactin ist in verschiedenen Krebserkrankungen überexprimiert und trägt zu Tumorzellinvasivität und Metastasierung bei (van Rossum et al., 2006). Außerdem zeigen viele Mitglieder der Ras-Onkogen-Familie, d.h. *RAB13, RAB20, RAB27A, RAB42* und *RAB7L1*, in L&H-Zellen erhöhte Expression im Vergleich zu GC-B-Zellen.

Neben den erwähnten Genen hat diese Analyse einige Signalwege, Überlebensmechanismen und gestörte Differenzierungsprogramme erkennen lassen, die wahrscheinlich zur Pathogenese des NLPHL beitragen. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten (3.3.6.2 – 3.3.6.6) dargestellt.

3.3.6.2 L&H-Zellen zeigen einen partiellen Verlust der B-Zellidentität

Um einen umfassenden Überblick über die Expression von B-Zellmarker in L&H-Zellen zu gewinnen, wurden informative *Probe sets* von B-Zellmarkern, die aus der Literatur bekannt sind ausgewählt, sowie Gene, die in den Profilen der normalen B-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen hochreguliert waren. Die Profile der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden von Frau Susan Eckerle (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) unter Anwendung derselben Methoden, wie in dieser Arbeit generiert, und freundlicherweise für die Analyse der B-Zellmarker zur Verfügung gestellt. Auf diese

Weise wurde eine Liste mit 61 B-Zellmarkern (94 informative *Probe sets*) generiert. Sechzig der 61 Gene zeigten statistisch signifikante erniedrigte Expression in L&H-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen (Abb. 17a).

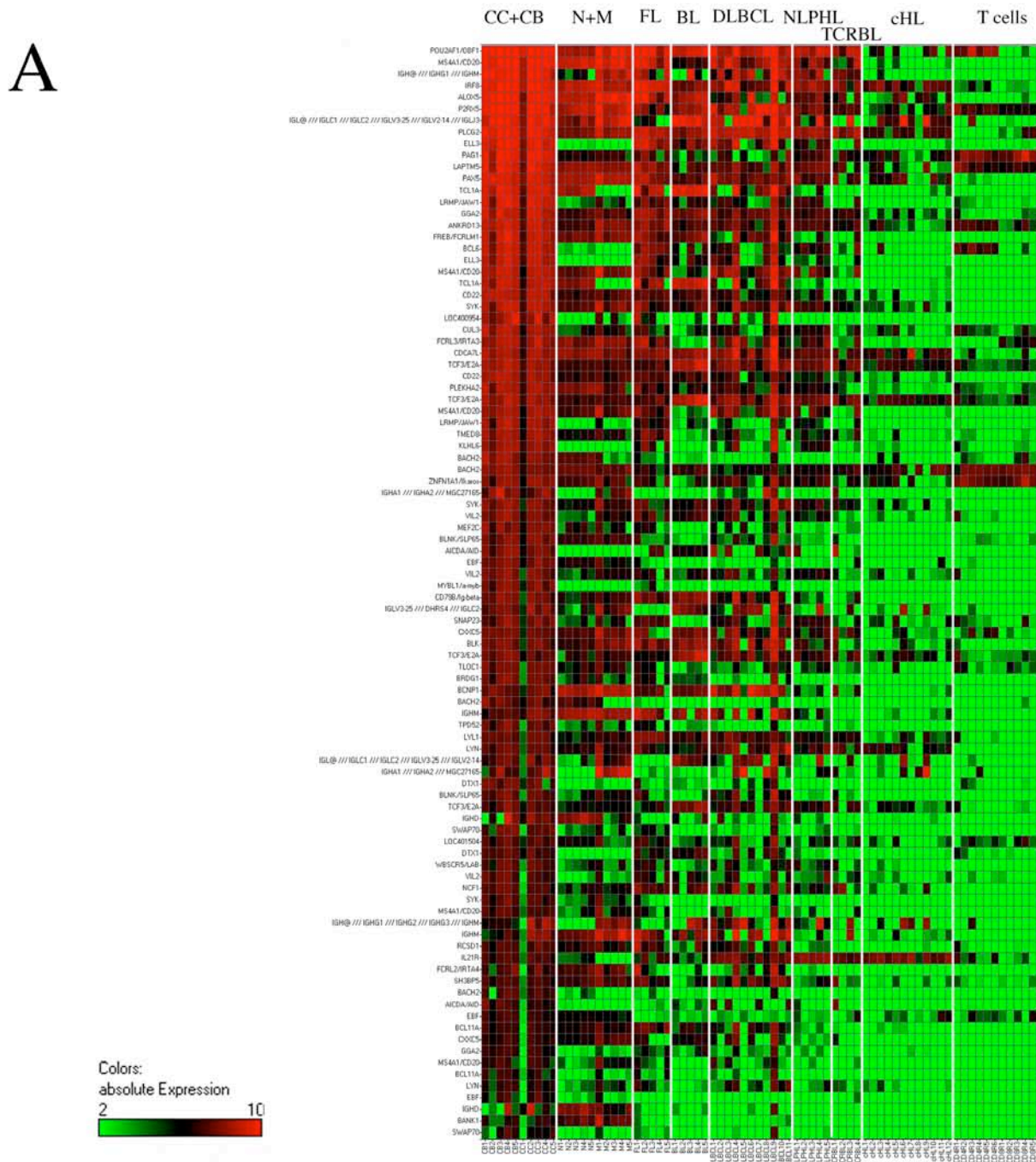


Abbildung 17: Partieller Verlust der B-Zellidentität in L&H-Zellen

(a) *Heatmap* der absoluten Expressionswerte der B-Zellmarker, die durch eine logarithmische (zur Basis 2) Farbskala codiert sind.

B

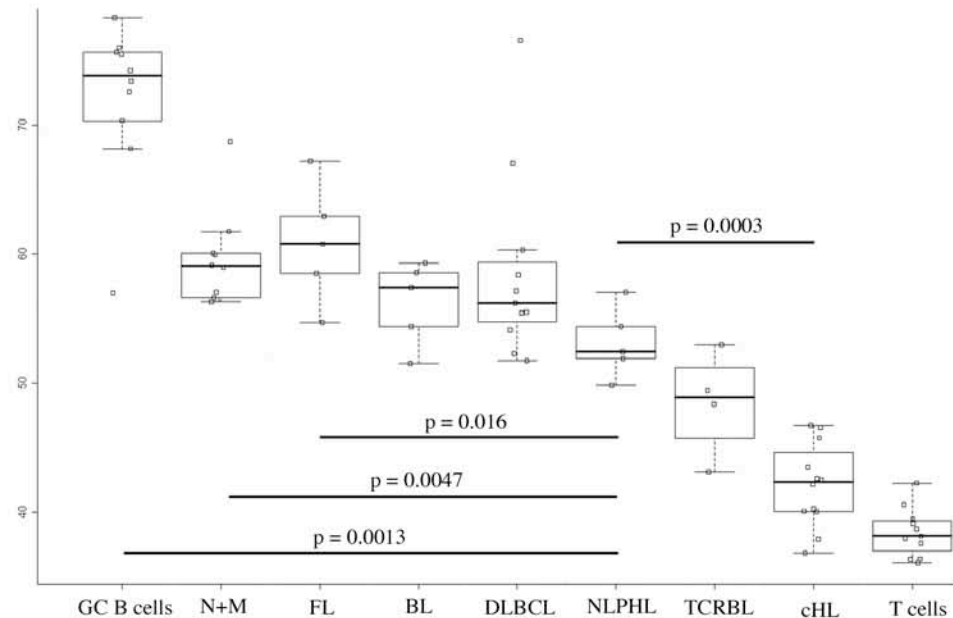


Abbildung 17: Partieller Verlust der B-Zellidentität in L&H-Zellen

(b) Individuelle Fälle (Quadrate) sind anhand der ersten Hauptkomponente der PCA der Expressionsmatrix der 61 B-Zellmarker dargestellt, die 92,2% der Gesamtvarianz beinhalten. Die *Box plots* fassen die Werte jeder Gruppe in dieser Komponente zusammen. Die Wilcoxon-Test P-Werte der paarweisen Vergleiche sind dargestellt.

Nur ein Gen, Interleukin-21-Rezeptor (*IL21R*), war 2,2-fach hochreguliert. Die runterregulierten B Linien-spezifischen Gene beinhalten u.a. BCR Signalmoleküle wie *CD79B*, *CD22*, *LYN*, *SYK* und *BLNK*, den transkriptionellen Aktivator der Ig Genexpression *POU2AF1* (*BOB1*), *Fc receptor-like molecules FCRLA*, *FCRL2* (*IRTA4*) und *FCRL3* (*IRTA3*), die GC-B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren *BACH2* (basic leucine zipper transcription factor 2), *IRF8* (interferon regulatory factor 8), *BCL6* und *MYBL1* (*a-myb*). Außerdem zeigten Transkriptionsfaktoren und -modulatoren, die für die B-Zellentwicklung sowie für die Festlegung und Aufrechterhaltung der B-Zellidentität von entscheidender Rolle sind, reduzierte Expression in L&H-Zellen.

Um die Expression der B-Zellmarker in jeder Entität quantifizieren zu können, wurde die erste Hauptkomponente der Expressionsmatrix der 61 B-Zellmarker in GC-B-Zellen (welche hohe Expression von B-Zell-spezifischen Genen repräsentieren) und in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (welche niedrige Expression von B-Zell-spezifischen Genen repräsentieren) errechnet. Die für jeden Datensatz angezeigte Auswertung entlang dieser Komponente wurde als Maß der Expression von B-Zell-spezifischen Genen verwendet. Der Unterschied zwischen den Datensätzen war sehr groß (Kruskal-Wallis-Test, $p=1e-09$) (Abb. 17b). L&H-Zellen zeigten eine signifikant reduzierte Expression von B-Zell-Genen verglichen mit GC-B-Zellen, naiven und Gedächtnis-B-Zellen. FL, BL und DLBCL zeigten ebenso eine signifikante Runterregulation von B-Zell-Genen im Vergleich zu GC-B-Zellen, was darauf hin deutet, dass dies eine gemeinsame Eigenschaft aller dieser von GC-B-Zellen ab-

3.3.6.3 L&H-Zellen zeigen einen anti-apoptotischen Phänotyp und kreieren ein immunsupprimierendes Mikromilieu

Colors:
absolute Expression
2 10

anti-apoptotische
Gene,
hochreguliert

pro-apoptotisch für
Nachbarzellen

pro-apoptotische Gene,
hochreguliert

pro-apoptotisch, aber
runterreguliert

Abbildung 18: Deregulation von Genen mit pro- oder anti-apoptotischer Funktion in L&H-Zellen

Die Expressionswerte der 38 Apoptose-assoziierten Gene, die ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster in L&H-Zellen im Vergleich mit GC-B-Zellen aufweisen, sind in einer *Heatmap* dargestellt. Spalten repräsentieren individuelle Fälle, Zeilen entsprechen den verschiedenen dargestellten Genen. Die absoluten Expressionswerte sind in einer logarithmischen Scala zur Basis 2 farbcodiert. Die Gene in der ersten Gruppe repräsentieren anti-apoptotische Gene, die in L&H-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen erhöhte Transkript-Level aufweisen. Die Gene in der zweiten Gruppe repräsentieren Gene mit pro-apoptotischen Funktionen in Nachbarzellen der L&H-Zellen, die erhöhte Expression in L&H-Zellen aufweisen. Die Gene in der dritten Gruppe repräsentieren pro-apoptotische Gene, die in L&H-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen hochreguliert sind. Die Funktion dieser Gene scheint jedoch durch die erhöhte Expression von CSTA und c-Flip und die Runterregulation von Caspase 2 in L&H-Zellen inhibiert zu sein. Die Gene in der vierten Gruppe repräsentieren pro-apoptotische Gene, deren Transkript-Level in L&H-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen verringert sind.

Von diesen 38 Genen sind 28 mit höheren und 10 mit niedrigeren Transkript-Leveln in L&H-Zellen ausgeprägt. Alle 21 Gene mit anti-apoptotischen Funktionen im extrinsischen

und/oder intrinsischen Apoptose-Signalweg sind in L&H-Zellen mit höheren Transkript-Leveln ausgeprägt und schließen Cathepsin B, Cystatin A (*CSTA*), Autotaxin, *CD59*, defender against death 1 (*DAD1*), BAX inhibitor 1 (*TEGT*), Galektin 3 (*LGALS3*), Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*) und *c-Flip* ein.

Zehn der 15 pro-apoptotischen Gene sind in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen herunterreguliert, z.B. Caspase 2 (*CASP2*), *Ataxia telangiectasia mutated* (*ATM*), die Serin/Threonine Kinasen 17a und 17b (*STK17A* und *STK17B*) und TNF receptor-associated factor 5 (*TRAF5*) (Abb. 18). Die Funktion der verbleibenden 5 pro-apoptotischen Gene, die in L&H-Zellen hochreguliert sind, scheint durch die erhöhte Expression von Cystatin A und *c-Flip* und die verringerte Expression von Caspase 2 inhibiert zu sein (Foghsgaard et al., 2001; Smyth et al., 2002; Wagner et al., 2004).

L&H-Zellen haben zudem verschiedene Mechanismen erworben, um der Immunüberwachung durch T- und NK-Zellen zu entgehen. Die Galektine 1, 2 und 3, die in L&H-Zellen hochreguliert sind (Abb. 18), können pro-apoptotische Signale in benachbarten T-Zellen auslösen und somit der Eliminierung von L&H-Zellen durch T-Zellen entgegenwirken (Ilarregui et al., 2005). Cathepsin B spaltet Perforin (Balaji et al., 2002) und sezerniertes IGF2R/M6PR kann als „Falle“ für das von CD8⁺ T-Zellen sezernierte Granzym B wirken (Motyka et al., 2000). MMP9, das sehr stark in L&H-Zellen hochreguliert ist (Tabelle 14), ist an der Resistenz gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität beteiligt (Fiore et al., 2002). Verschiedene MHC-I-Moleküle sind zwischen 2- und 5-fach in L&H-Zellen hochreguliert (Daten nicht gezeigt), wodurch deren Elimination durch NK-Zellen verhindert werden könnte. *CD59* (3,6-fach hochreguliert) inhibiert die Formation des *membrane attack Komplexes* und freies Annexin A2 (*ANXA2*; 6-fach hochreguliert) besitzt immunsupprimierende Eigenschaften (Aarli et al., 1997).

Das Überleben von L&H-Zellen scheint also durch das Zusammenspiel der Hochregulation zahlreicher anti-apoptotischer und der Runterregulation vieler pro-apoptotischer Gene sowie der Erschaffung eines immunsupprimierenden Mikromilieus gefördert zu werden.

3.3.6.4 L&H-Zellen sind durch eine starke NF-κB-Aktivität charakterisiert

Unter den zwischen L&H und GC-B-Zellen differentiell ausgeprägten Genen fanden sich zahlreiche NF-κB-Zielgene. Um die NF-κB-Aktivität in L&H-Zellen detaillierter zu untersuchen wurde eine umfangreiche Liste mit 62 informativen *Probe sets* für 50 NF-κB-Zielgene generiert (siehe Legende zu Abb. 19). GC-B-Zellen zeigten keine signifikante Expression von NF-κB-Zielgenen und HRS-Zellen zeigten, wie erwartet, starke Expression (Bargou et al., 1997; Basso et al., 2004). Diese Liste von NF-κB-Zielgenen ist also gut geeignet, um zwischen Fällen mit und ohne NF-κB-Aktivität zu unterscheiden. Interessanterweise konnte in L&H-Zellen starke Expression (in vergleichbarem Ausmaß wie in HRS-Zellen) von 48/50 NF-κB-Zielgenen identifiziert werden. Nur zwei Gene (*CCL22* und *IL6*) wiesen Signalstärken unter Hintergrundniveau auf (Abb. 19a).

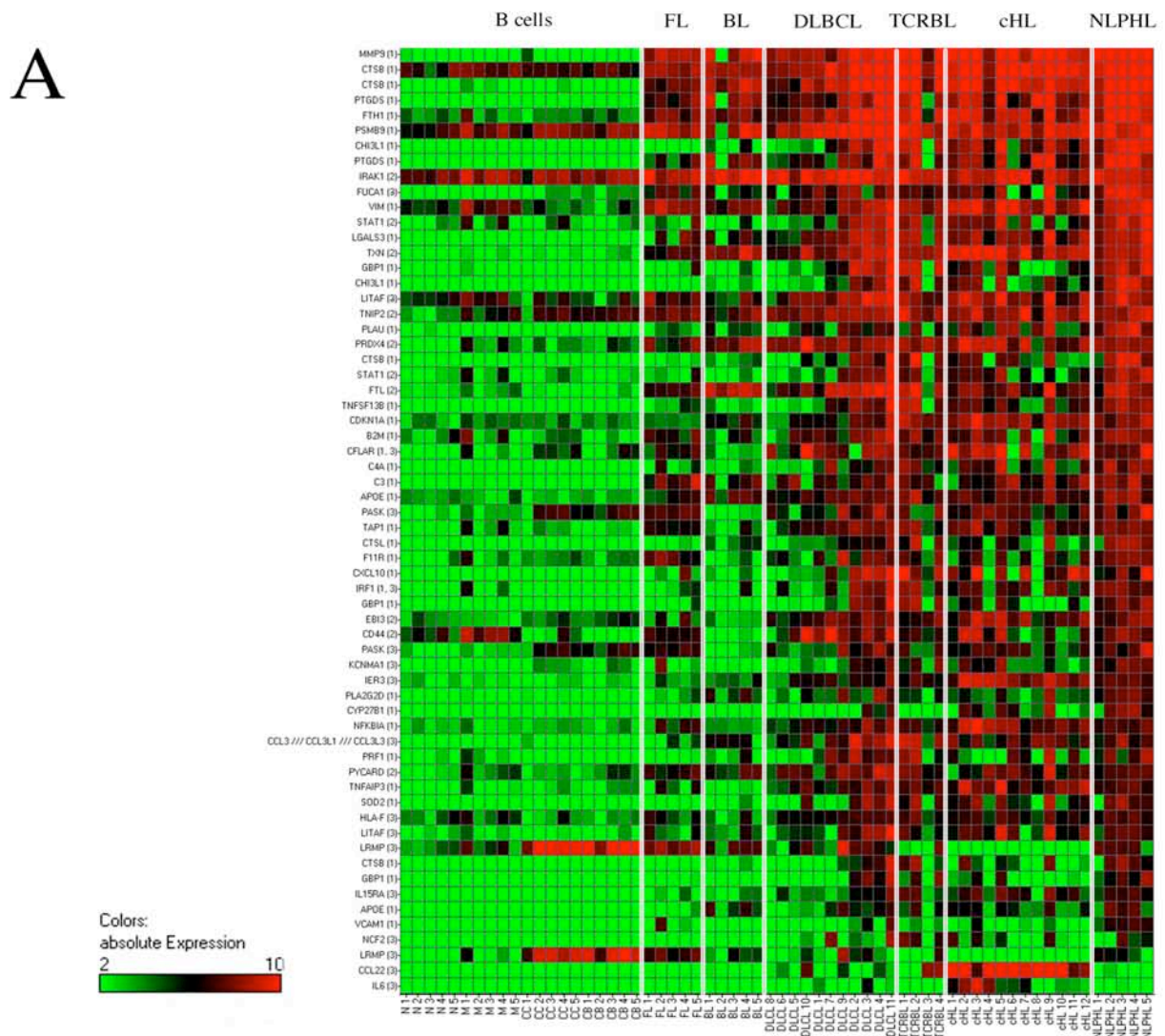


Abbildung 19: NF- κ B-Aktivität in L&H-Zellen

Die Liste der experimentell in cHL-Zelllinien validierten NF- κ B-Zielgene (Hinz et al., 2002) wurde um andere NF- κ B-Zielgene erweitert, die in der Literatur und unter www.nf-kb.org beschrieben sind. Alle nicht-informativen *Probe sets* (Signalstärken unter Hintergrundniveau in allen Profilen) blieben unberücksichtigt. Die Liste enthielt somit 62 *Probe sets*, die 50 NF- κ B-Zielgenen entsprechen, von denen 48 in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen konsistent hochreguliert sind ($FDR < 0,05$ nach t-Test; $-1,8 \leq FC \leq 1,8$).

(a) *Heatmap* der absoluten Expressionswerte der NF- κ B-Zielgene, die durch eine logarithmische (zur Basis 2) Farbskala codiert sind. Quelle der NF- κ B-Zielgene ist: 1, www.nf-kb.org; 2, Literatur; 3, Hinz et al., 2002.

(b) Individuelle Fälle (Quadrate) sind anhand der ersten Hauptkomponente der PCA der Expressionsmatrix der 50 NF- κ B-Zielgene dargestellt, die 80,1% der Gesamtvarianz beinhalten. Die *Box plots* fassen die Werte jeder Gruppe in dieser Komponente zusammen. Die Wilcoxon-Test p-Werte der paarweisen Vergleiche sind dargestellt.

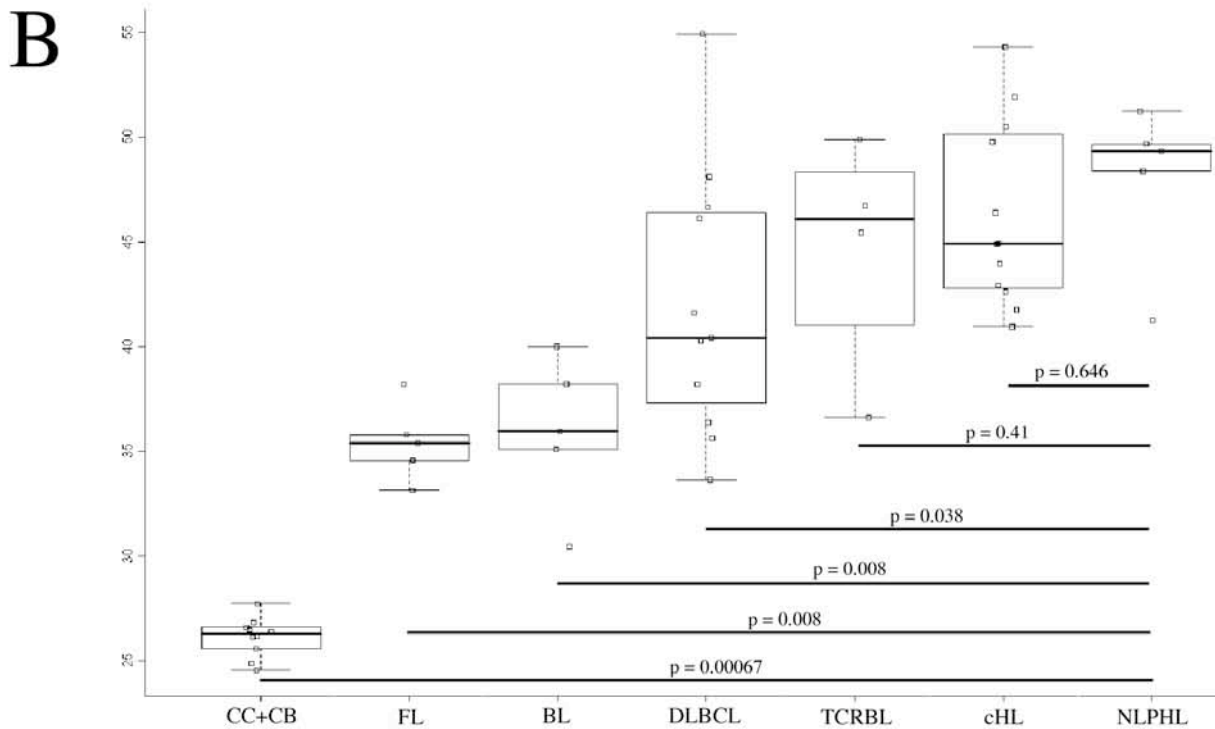


Abbildung 19: NF-κB-Aktivität in L&H-Zellen

Die Liste der experimentell in cHL-Zelllinien validierten NF-κB-Zielgene (Hinz et al., 2002) wurde um andere NF-κB-Zielgene erweitert, die in der Literatur und unter www.nf-kb.org beschrieben sind. Alle nicht-informativen *Probe sets* (Signalstärken unter Hintergrundniveau in allen Profilen) blieben unberücksichtigt. Die Liste enthielt somit 62 *Probe sets*, die 50 NF-κB-Zielgenen entsprechen, von denen 48 in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen konsistent hochreguliert sind ($FDR < 0,05$ nach t-Test; $-1,8 \leq FC \leq 1,8$).

(a) *Heatmap* der absoluten Expressionswerte der NF-κB-Zielgene, die durch eine logarithmische (zur Basis 2) Farbskala codiert sind. Quelle der NF-κB-Zielgene ist: 1, www.nf-kb.org; 2, Literatur; 3, Hinz et al., 2002.

(b) Individuelle Fälle (Quadrate) sind anhand der ersten Hauptkomponente der PCA der Expressionsmatrix der 50 NF-κB-Zielgene dargestellt, die 80,1% der Gesamtvarianz beinhalten. Die *Box plots* fassen die Werte jeder Gruppe in dieser Komponente zusammen. Die Wilcoxon-Test p-Werte der paarweisen Vergleiche sind dargestellt.

In Einklang mit publizierten Daten weisen FL und BL niedrige und DLBCL heterogene NF-κB-Aktivität auf (Dave et al., 2006; Davis et al., 2001). In ca. der Hälfte der DLBCL (einschließlich DLBCL 2, 3 und 11, die einige Ähnlichkeiten zu NLPHL aufweisen – Abb. 13 und 16) sind die meisten der NF-κB-Zielgene ausgeprägt. Auch TCRBL scheint in den meisten Fällen eine starke NF-κB-Aktivität zu besitzen.

Um die Expression von NF-κB-Zielgenen in jeder Entität quantifizieren zu können, wurde die erste Hauptkomponente der Expressionsmatrix der NF-κB-Zielgene in HRS-Zellen (welche hohe Expression von NF-κB-Zielgenen repräsentieren) und in GC-B-Zellen (welche niedrige Expression von NF-κB-Zielgenen repräsentieren) errechnet. Die für jeden Datensatz angezeigte Auswertung entlang dieser Komponente wurde als Maß der Expression von NF-κB-Zielgenen verwendet. Der Unterschied zwischen den Datensätzen war sehr groß (Kruskal-Wallis-Test, $p = 3e-09$) (Abb. 19b). NLPHL wies in dieser PCA die

stärkste NF- κ B-Aktivität auf, mit einer hohen statistischen Signifikanz verglichen mit GC-B-Zellen, FL, BL und DLBCL sowie einer Tendenz verglichen mit cHL und TCRBL (Abb. 19b).

Um die NF- κ B-Expression und Aktivität in L&H-Zellen zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper durchgeführt, der ein Epitop erkennt, das nur dann für den Antikörper zugänglich ist, wenn NF- κ B-Heterodimere aktives p65 enthalten (Zabel et al., 1993). In 19/19 analysierten NLP HL konnte starke p65 Expression festgestellt werden (Abb. 21a). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass L&H-Zellen starke konstitutive NF- κ B-Aktivität und erhöhte Expression der meisten NF- κ B-Zielgene aufweisen.

3.3.6.5 ERK-Aktivierung spielt zumindest in einem Teil der NLP HL-Fälle eine Rolle

Einige, der in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen hochregulierten Gene, implizieren Aktivierung des ERK-Signalweges in L&H-Zellen. KISS1 Rezeptor (10,4-fach hochreguliert), Galektin 1 (4,5-fach hochreguliert), *chitinase 3-like 1* (*CHI3L1*; 36,3-/20,4-fach hochreguliert), Mitglied der SLAM Familie 7 (13,9-fach hochreguliert), und *syndecan binding protein* (*SDCBP*; 2,6-fach hochreguliert) aktivieren ERK (Bouchon et al., 2001; Boucher et al., 2005; Recklies et al., 2002; Ringel et al., 2002; Scott und Weinberg, 2004). Von *Ras homolog gene family member H* (*RHOH*), das in L&H-Zellen 2,3-fach herunterreguliert ist, ist beschrieben, dass es ERK-Aktivierung unterdrückt (Li et al., 2002). *PLAU* (9,1-fach hochreguliert) ist ein ERK-Zielgen und zugleich auch die Hauptbestimmungsgröße von ERK-Aktivierung (Alfano et al., 2005). Zudem sind viele zusätzliche transkriptionelle Zielgene des ERK-Signalweges, nämlich *DR5*, *STAT3*, *MMP9*, *CDKN1A* (*p21^{CIP1/WAF1}*) und Cathepsin B (Drosopoulos et al., 2005; Frias et al., 2007; Krueger et al., 2005; Lai et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2004), in L&H-Zellen hochreguliert. Vier dieser sechs Gene sind auch NF- κ B-Zielgene (Abb. 19a).

Um zu überprüfen, ob L&H-Zellen ERK aberrant aktivieren, wurden immunhistochemische Analysen an Paraffinschnitten von NLP HL und normalen Tonsillen mit Antikörpern gegen Gesamt-ERK und phosphoryliertes ERK (p-ERK) durchgeführt. So wie bereits beschrieben (Zheng et al., 2003) waren normale GC-B-Zellen positiv für ERK, aber negativ für p-ERK (Daten nicht gezeigt). Unter den NLP HL prägten 10/14 Fällen ERK aus und 4/12 Fälle waren positiv für p-ERK in einem Teil der L&H-Zellen (Abb. 21b und c). Die wahre Anzahl der p-ERK-positiven Fälle ist wahrscheinlich höher, denn aufgrund unzureichender Fixierung des Probenmaterials kann es zum Verlust von Phosphogruppen kommen (Mandell, 2003). Da STAT1 von ERK phosphoryliert und somit aktiviert werden kann (Hilger et al., 2002), wurden NLP HL-Fälle für p-STAT1 immunhistochemisch gefärbt. In mehr als der Hälfte der NLP HL-Fälle konnte die nukleäre Lokalisation von p-STAT1 in einem Teil der L&H-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21j). Somit spricht der häufige Nachweis von p-

3.3.6.6 Extrazelluläre Matrix (ECM) Degradation und *tissue remodeling*

Colors: absolute Expression
2 10

In einer *Heatmap* sind die Expressionswerte der Gene, die mit ECM Degradation und *tissue remodeling* assoziiert sind dargestellt. Spalten repräsentieren individuelle Fälle, Zeilen entsprechen den verschiedenen dargestellten Genen. Die absoluten Expressionswerte sind in einer logarithmischen Scala zur Basis 2 farbcodiert.

Um die Verlässlichkeit dieser Analyse weiter zu validieren und um zu überprüfen, ob die hochregulierten mRNA-Level mit erhöhten Protein-Levels korrespondieren, wurden NLPHL-Fälle und reaktive Tonsillen auf die Protein-Expression von Cathepsin B, MMP9, MMP12, Galektin 3, p-STAT1, EOMES und IL21R mittels Immunhistochemie überprüft (Abb. 21d-j). Diese Gene wurden ausgewählt, da geeignete Antikörper vorhanden waren und sie pathogenetische Relevanz besitzen könnten.

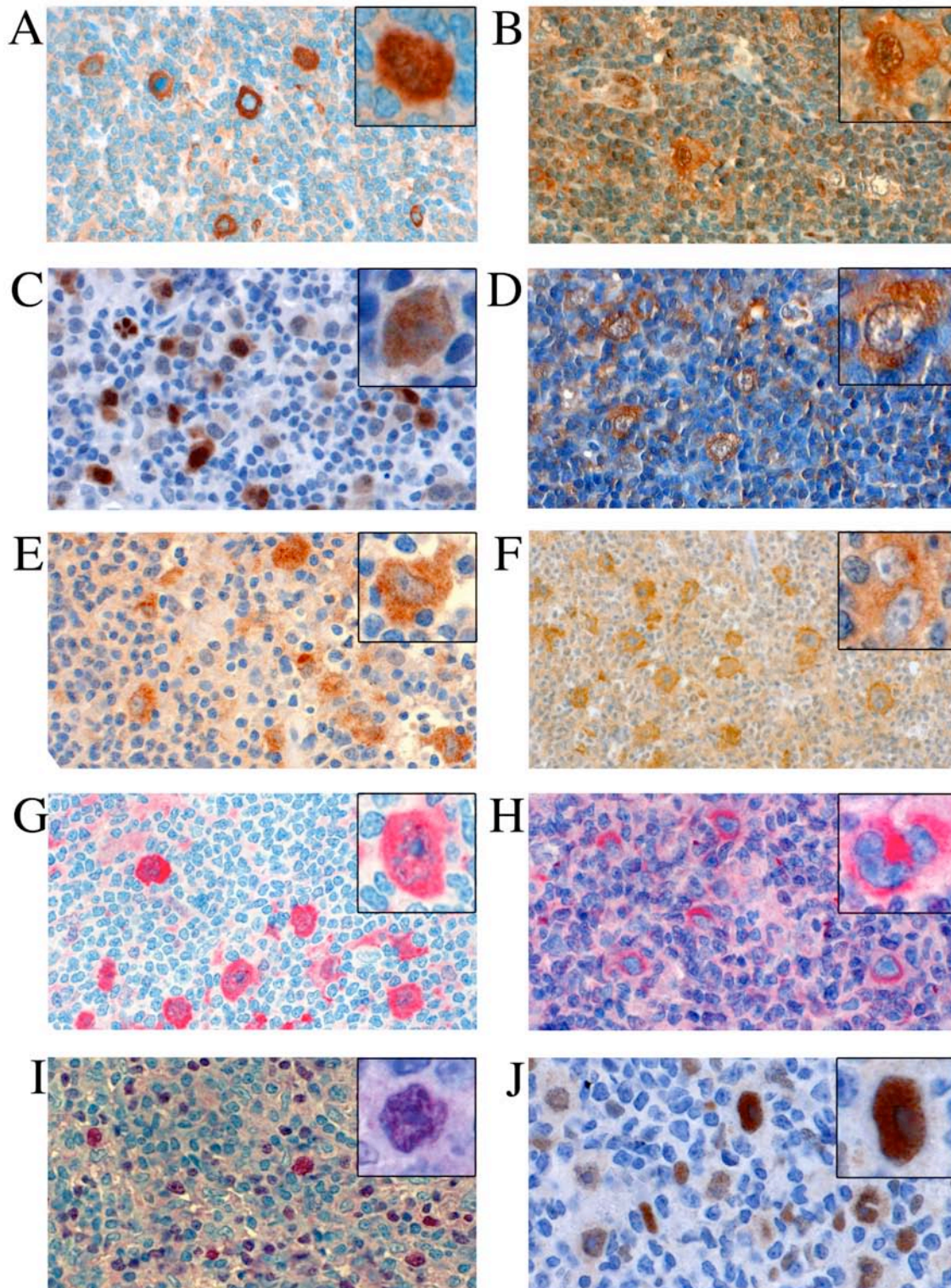


Abbildung 21: Protein Expression in NLP HL-Fällen

Immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten von Lymphknoten von NLP HL-Patienten für die aktive NF- κ B-Untereinheit p53 (a), Gesamt-ERK (b), aktives phosphoryliertes ERK (c), CTSB (d), MMP9 (e), MMP12 (f), LGALS3 (g), IL21R (h), EOMES (i) und p-STAT1 (j). Der anti-NF- κ B-Antikörper kann nur an p53 binden, das nicht länger von I κ B-Faktoren gebunden ist, und identifiziert somit nur aktives NF- κ B, obwohl die Färbung oft hauptsächlich zytoplasmatisch erscheint (Zabel et al., 1993). Original Vergrößerung: x400, Einsätze x1000, einige Einsätze (A, B, D, E, G, J) wurden mittels der Adobe Photoshop CS Software (Adobe Systems) vergrößert.

Mit der Ausnahme von IL21R (siehe unten) zeigten normale tonsilläre GC-B-Zellen wie erwartet keine oder nur leichte Hintergrundfärbung (Tabelle 14). Alle diese analysierten Marker zeigten konsistente und meist starke Expression in L&H-Zellen der meisten oder sogar aller analysierten NLPHL (Tabelle 14). Obwohl die Affymetrix-Daten nur auf eine 2,2-fache Hochregulation von IL21R-Transkripten in L&H-Zellen verglichen mit GC-B-Zellen hinwiesen, konnte in einigen NLPHL eine stärkere Expression in L&H als in GC-B-Zellen festgestellt werden. Insgesamt bestätigen die immunhistochemischen Analysen die erhöhte Expression dieser Gene in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen in der großen Mehrzahl der Fälle.

Tabelle 14: Immunhistochemische Expression von Genen mit höheren Transkript-Levels in L&H verglichen mit GC-B-Zellen

Genname	Affymetrix set ID	Probe	Hochregulation in L&H versus GC-B-Zellen (FC)	Positivität in primären NLPHL Fällen (%) ^a	Positivität in GC-B-Zellen
CTSB	200839_s_at		44,7	19/19 (100)	schwache Hintergrundfärbung
	200838_at		14,6		
	213274_s_at		14,3		
	213275_x_at		14,1		
	227961_at		6,2		
MMP9	203936_s_at		60,2	15/16 (94)	schwache Hintergrundfärbung
MMP12	204580_at		25,4	15/17 (88)	schwache Hintergrundfärbung
LGALS3	208949_s_at		25,8	15/15 (100)	negativ
IL21R	221658_s_at		2,2	7/7 (100)	positiv
EOMES	231776_at		4,1	10/15 (67)	negativ
p-STAT1	209969_s_at		17,7 (STAT1 β)	11/19 (58)	negativ
	200887_s_at		8,7 (STAT1 α)		
	AFFX-HUMISGF3A/		6,4 (STAT1 α)		
	M97935_3_at				

^aEin Fall wurde als positiv bewertet, wenn $\geq 20\%$ der L&H-Zellen Expression des jeweiligen Markers zeigten. Für CTBS, MMP9, MMP12, LGALS3 und IL21R waren fast alle L&H-Zellen positiv. Die Positivität der Expression in L&H-Zellen von EOMES und p-STAT1 variierte von 20-80%. p-STAT1 konnte in einem Teil der L&H-Zellen in 11/19 Fällen detektiert werden, womit vielleicht die Frequenz der positiven Fälle unterschätzt wird, denn aufgrund unzureichender Fixierung des Probenmaterials kann es zum Verlust von Phosphogruppen kommen.

4. Diskussion

4.1 Etablierung einer Methode zur genomweiten Genexpressionsanalyse weniger Zellen

In einer Reihe von Studien zur globalen Genexpression in Lymphomen wurden Ganzschnitte des Lymphom-Gewebes verwendet. Dadurch ist es schwierig, den zellulären Ursprung der differentiell ausgeprägten Gene zu identifizieren, da die Lymphomzellen immer mit nicht-malignen infiltrierenden Zellen vermischt sind. Ganzschnittanalysen können zwar für prognostische Zwecke sinnvoll sein, oder um Einblicke in spezifische Eigenschaften des Lymphom-Mikromilieus zu gewinnen (Alizadeh et al., 2000; Dave et al., 2004; Monti et al., 2005; Rosenwald et al., 2002). Um Einblicke in die Biologie der Lymphomzellen zu gewinnen, ist es unerlässlich, die Lymphomzellen zu isolieren.

Das Standard-T7-RNA-Polymerase-basierte Protokoll mit einer Runde *in vitro* Transkription (IVT) benötigt 5 µg Gesamt-RNA als Startmaterial. Neuere technische Verbesserungen erlauben den Einsatz von nur 1 µg Gesamt-RNA. Jedoch entspricht selbst 1 µg Gesamt-RNA ca. 10^5 bis 10^6 Zellen. Für die Analyse seltener Zellpopulationen, wie z.B. HRS- und L&H-Zellen, ist das Standardprotokoll somit nicht anwendbar. Die Etablierung eines reproduzierbaren und verlässlichen 2-Runden-T7-RNA-Polymerase-basierten Amplifikationsprotokolls war ein wichtiger Schritt, der die Analyse der genomweiten Genexpression von kleinen Zellmengen erlaubt. Wie in 3.1.3.4 beschrieben, bergen Amplifikationsmethoden das Risiko, dass ursprüngliche Transkriptlevel verzerrt werden. Der Verlust der Signalstärke für *Probes*, die relativ weit 5' in der mRNA lokalisiert sind, ist eine charakteristische Eigenschaft aller linearen Amplifikationsmethoden. Die Verkürzung der cRNA-Fragmente ist hauptsächlich durch die ineffiziente Reverse Transkription und die Verwendung von *random* Hexamer Primern (siehe Abb. 7) bedingt, was zwangsläufig zum Verlust von Signalen für Zielsequenzen führt, die weiter 5' in der Gensequenz liegen. Im Amplifikationsprotokoll wirkt sich dies noch stärker aus als im Standardprotokoll, da durch die zweite IVT eine zusätzliche weitere Verkürzung der cRNA-Fragmente stattfindet. Die Eigenschaft der Verkürzung der cRNA-Fragmente zeigte sich auch in der in dieser Arbeit etablierten Methode. Die RNA-Amplifikation ist jedoch die einzige Möglichkeit primäre HRS- und L&H-Zellen zu analysieren. Deshalb muss bei der Datenanalyse bedacht werden, dass zu vielen Genen keine Informationen über deren Expression und Expressionsstärke vorliegen werden. Die Verwendung von Affymetrix GeneChip® Human X3P Arrays könnte das Problem des Verlusts von Information durch verkürzte cRNA Fragmente teilweise lösen, da für diesen Array Oligonukleotid-Sonden verwendet wurden, die näher am 3'-Ende der Transkripte liegen. Dennoch wurden in dieser Analyse, obwohl ein 2-Runden-Amplifikationsprotokolls und Affymetrix GeneChip® Human U133 Plus 2.0 Arrays verwendet wurden, viele Gene identifiziert, deren Expression in L&H-Zellen bereits aus früheren Studien bekannt war. Auch alle neu identifizierten Gene, die durch immun-

histochemische Färbungen untersucht wurden, konnten validiert werden. Bei der Identifizierung von differentiell regulierten (funktionellen) Gengruppen (z.B. NF- κ B-Zielgene, B-Zellsignatur) spielt es zudem eine untergeordnete Rolle, wenn *Probe sets* einzelner Gene aufgrund der verkürzten cRNA-Fragmente nicht funktionieren und somit zur Expression dieser Gene keine Informationen vorliegen.

Zu Beginn der Etablierungen standen keine Protokolle bzw. Kits zur Verfügung, die für ca. 1000 lasermikrodissektierte Zellen (ca. 2-5 ng Gesamt-RNA) geeignet waren. Die beiden in der Etablierung getesteten Kits, der RiboAmp Kit (Arcturus) und der SuperSMART Kit (Clontech) waren nur für eine Startmenge von empfohlenen 20 ng bzw. 50 ng Gesamt-RNA geeignet. Der SuperSMART Kit erwies sich als nicht geeignet, um die RNA von ca. 1000 Zellen zu amplifizieren. Der RiboAmp Kit konnte für die Amplifikation von 2-5 ng Gesamt-RNA aus ca. 1000 lasermikrodissektierten Zellen modifiziert und optimiert werden. Leider führten Schwankungen in der Qualität sowohl des ENZO Labeling Kits als auch des RiboAmp Kits (zumindest bei einer Startmenge von 2-5 ng Gesamt-RNA) dazu, dass viele Proben aufgrund von schlechten und nicht für eine Hybridisierung ausreichenden Amplifikationsraten wiederholt werden mussten, wodurch erhebliche zusätzliche Kosten und zeitliche Verzögerungen entstanden. Mittlerweile sind neue Kits kommerziell erhältlich, wie z.B. der MessageAmpTM II aRNA Amplifikation Kit (Ambion; eingesetzt für die erste Runde der Amplifikation) in Verbindung mit dem MessageAmpTM II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplifikation Kit (Ambion; eingesetzt für die zweite Runde der Amplifikation, die gleichzeitig die aRNA biotin-markiert), der für Gesamt-RNA Mengen von 0,1-100 ng genutzt werden kann. Da dieser Kit von vornherein für geringere Startmengen ausgelegt ist, bliebe zu überprüfen, ob sich dieser oder ähnliche Kits mittlerweile besser zur Amplifizierung von 2-5 ng Gesamt-RNA (entsprechend ca. 1000 lasermikrodissektierter Zellen) eignen, als das in dieser Arbeit etablierte Amplifikationsprotokoll.

4.2 RT-PCR-Analysen lasermikrodissektierter HRS-Zellen für HRS-Zellspezifische Gene

Eine Besonderheit von HL-Zelllinien ist, dass sie von Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nach zum Teil mehrfacher Therapie mit Chemotherapeutika und Bestrahlungen etabliert wurden und, dass die HRS-Zellen nicht aus den betroffenen Lymphknoten, sondern z.B. aus pleuralen oder pericardialen Ausschwemmungen, peripherem Blut oder Knochenmark stammen (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996). Primäre HRS-Zellen sind jedoch in hohem Maße von den Signalen des umgebenden zellulären Infiltrats abhängig (Küppers und Re, 2007). Deshalb ist davon auszugehen, dass in den HRS-Zellen der HL-Zelllinien einige zelluläre Änderungen im Vergleich zu den Eigenschaften der primären HRS-Zellen stattgefunden haben. Dass anhand von Genexpressionsanalysen an HL-Zelllinien jedoch trotzdem allgemeingültige Aussagen zur Pathogenese des HL getroffen werden können, kann durch die erfolgreiche Validierung der Ergebnisse ge-

zeigt werden, in der erstmals die Genexpression lasermikrodissektierter HRS- und L&H-Zellen mittels RT-PCR analysiert wurden. Interessanterweise zeigten vier von fünf untersuchten HRS-Zell-spezifischen Genen ebenfalls Expression in den L&H-Zellen zweier untersuchter NLPHL. Dies deutet auf eine größere Ähnlichkeit von HRS- und L&H-Zellen als bisher angenommen hin. Dieser Aspekt wird im Vergleich der globalen Genexpression von L&H- und HRS-Zellen weitergehend untersucht.

4.3 Genomweite Genexpressionsanalysen

4.3.1 L&H- und HRS-Zellen sind in ihrem Genexpressionsmuster sehr ähnlich

NLPHL und cHL sind als zwei Subtypen des HL klassifiziert und einige Gene wurden bereits als in L&H- und HRS-Zellen aberrant ausgeprägt beschrieben (Küppers et al., 2003; Maggio et al., 2002; Niedobitek et al., 2002). Andererseits betonen viele Studien klinische, phänotypische und genetische Unterschiede zwischen L&H- und HRS-Zellen (Falini et al., 1996; Greiner et al., 2005; Hansmann et al., 1999; Küppers, 2002). Vor diesem Hintergrund war es überraschend, nur sehr wenige differentiell ausgeprägte Gene zwischen L&H- und HRS-Zellen zu identifizieren. Die gewählte Herangehensweise führte vielleicht zu einer Unterbewertung der Unterschiede zwischen L&H- und HRS-Zellen, da HRS-Zellen durchaus sehr heterogen in ihrer Genexpression sein können, der Fokus dieser Arbeit aber auf Genen mit konsistenter differentieller Expression lag. Viele phänotypischen Unterschiede zwischen L&H- und HRS-Zellen, die in dieser Analyse identifiziert wurden und auch die, die in der Literatur beschreiben sind, stehen mit der starken Unterregulation von B-Zellmarkern in HRS-Zellen in Zusammenhang, die in L&H-Zellen jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie in HRS-Zellen (Dieser Aspekt wird später in Kapitel 4.3.4 diskutiert). Dennoch konnten einige wenige zusätzliche Unterschiede in der Genexpression von L&H- und HRS-Zellen identifiziert werden (Tabelle 11). Durch weitere Analysen sollte herausgefunden werden, welche dieser Unterschiede individuelle pathogenetische Mechanismen im NLPHL und cHL reflektieren oder für sie verantwortlich sind. Basierend auf den großen Gemeinsamkeiten in ihrem histologischen Erscheinungsbild (noduläres Wachstumsmuster, Assoziation mit CD57⁺CD4⁺ GC T Helferzellen und folliculären dendritischen Zellen), dem Phänotyp der Lymphomzellen (CD20⁺, BCL6⁺, AID⁺, centerin⁺, HGAL⁺) und den genetischen Eigenschaften (Selektion auf funktionelle IgV Gene, aktive *ongoing* somatische Hypermutation), wäre zu erwarten, dass L&H-Zellen den Lymphomzellen des FL ähnlicher sind als HRS-Zellen. Diese Studie hat jedoch gezeigt, dass L&H-Zellen auf Ebene der globalen Genexpression viel ähnlicher zu HRS-Zellen als zu Lymphomzellen des FL sind.

4.3.2 Nur wenige Gene unterscheiden L&H-Zellen von den Lymphomzellen des TCRBL

Es stellte sich heraus, dass L&H-Zellen den neoplastischen Zellen des TCRBL und einer Untergruppe der DLBCL am ähnlichsten sind. Die TCRBL, die nahe den NLP HL im *Unsupervised hierarchical clustering* lagen, zeigten auch ein ähnliches Expressionsmuster wie die L&H-Zellen für L&H-spezifische Gene, NF- κ B-Zielgene und Apoptose-assoziierte Gene. Große phänotypische und immunhistochemische Ähnlichkeiten dieser beiden Lymphome wurden bereits beschrieben (Boudová et al., 2003; Jaffe et al., 2001). Die Tumorzellen beider Lymphome stammen von mutierenden GC-B-Zellen ab, da sie klonale mutierte Ig-Gen-Umlagerungen mit intraklonaler Diversität tragen (Braeuninger et al., 1997; Bräuninger et al., 1999b). Einige NLP HL weisen eine Progression zu TCRBL auf. Zudem gibt es eine diagnostische „Grauzone“ zwischen beiden Entitäten (Jaffe et al., 2001). Auch CGH-Analysen zeigten Gemeinsamkeiten, jedoch auch einige Unterschiede. So zeigten NLP HL ein komplexeres Muster chromosomaler Veränderungen als TCRBL (Franke et al., 2002). Die beschriebene biologische, phänotypische und klinische Verwandtschaft dieser Lymphome wurde somit in dieser Analyse auf einer genomweiten Ebene erweitert. Trotz der morphologischen und phänotypischen Gemeinsamkeiten sind der klinische Verlauf und die Therapie von TCRBL und NLP HL verschieden. Daher hat die Differentialdiagnose zwischen TCRBL und NLP HL wichtige therapeutische Konsequenzen. Bislang ist nur vom Transkriptionsfaktor PU.1 beschrieben, dass er häufiger in L&H-Zellen als in den Lymphomzellen des TCRBL ausgeprägt wird. In dieser Analyse wurden 42 differentiell ausgeprägte Gene identifiziert (Abb. 15 und Tabelle 11), die geeignet sein könnten, neue immunhistologische Marker für die Differentialdiagnose zu etablieren.

4.3.3 L&H-Zellen gleichen GC-B-Zellen im Übergang zu Gedächtnis-B-Zellen

Obwohl L&H-Zellen GC-B-Zellen in vielen phänotypischen und genetischen Aspekten gleichen, deutet ihr Genexpressionsprofil darauf hin, dass sie von transformierten späten GC-B-Zellen im Differenzierungsprozess zu Gedächtnis-B-Zellen abstammen. Diese Hypothese wird durch die Feststellung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in L&H-Zellen gestützt, da eine Subpopulation von Zentrozyten in der hellen Zone des Keimzentrums, die vermutlich zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, aktives NF- κ B ausprägen, wohingegen die Mehrheit der GC-B-Zellen keine NF- κ B-Aktivität aufweist (Basso et al., 2004). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die NF- κ B-Aktivität erst nach der neoplastischen Transformation einer GC-B-Zelle in eine L&H-Zelle aufgetreten ist und somit nicht mit der Ursprungszelle des NLP HL in Verbindung steht.

Die verminderte Expression von B-Zell-spezifischen Genen (vgl. Kapitel 3.3.6.2 und 4.3.4) könnte auf eine phänotypische Ähnlichkeit zwischen L&H-Zellen und Plasmazellen hindeuten (Liberg und Sigvardsson, 1999). Sowohl die fehlende Expression typischer Plasmazell-spezifischer Gene (siehe zusätzliche Abb.1 im Anhang; (Carbone et al.,

1997)) als auch die geringere Ähnlichkeit von L&H-Zellen zu Plasmazellen im Vergleich zu GC-B-Zellen sowie zu Gedächtnis-B-Zellen (Abb. 14b) sprechen allerdings gegen die Theorie einer Plasmazelldifferenzierung von L&H-Zellen.

4.3.4 L&H-Zellen zeigen einen partiellen Verlust der B-Zellidentität

Frühere Studien beschrieben, dass L&H-Zellen normalerweise generelle B-Zellmarker und GC-B-Zell-spezifische Moleküle ausprägen (Carbone et al., 1998; Falini et al., 1996; Greiner et al., 2005; Hansmann et al., 1999; Marafioti et al., 2004a; Montes-Moreno et al., 2008; Natkunam et al., 2005; Steimle-Grauer et al., 2003). Jedoch lässt sich die Expression mancher B-Zellmarker auf dem Niveau der Sensitivität von immunhistochemischen Analysen nicht nachweisen (Dogan et al., 2000; Marafioti et al., 2003; Marafioti et al., 2004a; Marafioti et al., 2004b; Masir et al., 2006; Paterson et al., 2006; Tedoldi et al., 2006b; Tedoldi et al., 2007; Uherova et al., 2003). Diese Daten sind jedoch nicht quantitativ und zudem beschränkt auf einige wenige Proteine. In der Analyse einer umfangreichen Liste von 61 B-Linien-spezifischer Gene wurden 60 Gene identifiziert, die in L&H-Zellen im Vergleich zu GC-B-Zellen nicht ausgeprägt oder nur reduziert transkribiert werden. Unter diesen Genen sind auch viele bereits beschriebene Gene.

Die verminderte Expression der B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren PAX5, E2A, EBF, Ikaros, BCL11A und des Notch1-Inhibitors Deltex 1 resultiert sehr wahrscheinlich in einer verminderten Expression zahlreicher B-Zellgene und ist daher wahrscheinlich der Hauptgrund für den partiellen Verlust des B-Zellphänotyps in L&H-Zellen. Zudem könnte die aberrante Expression von ID2 (einem negativen Regulator von E2A) in L&H-Zellen (Renné et al., 2006) zusätzlich zur verminderten Expression vieler B-Linien-spezifischer Gene beitragen. Dies könnte durch epigenetische Inaktivierung hervorgerufen sein, jedoch können Promotormethylierungen den Verlust der Expression von CD10, CD19 oder LCK in L&H-Zellen nicht erklären (Tedoldi et al., 2007).

Nur ein einziges B-Zell-assoziiertes Gen, nämlich *IL21R*, war in L&H-Zellen hochreguliert und zeigte auch eine Tendenz zu erhöhter Proteinexpression. Da folliculäre T-Zellen die Hauptproduzenten von IL21 sind und IL21R Stimulierung das Überleben von GC-B-Zellen verbessert, könnte die verstärkte IL21R Expression für das Überleben der L&H-Zellen und für ihre Interaktion mit den umgebenden T-Helferzellen wichtig sein (Good et al., 2006). Der globale Verlust des B-Zellphänotyps könnte von selektivem Vorteil für die HRS (Vorläufer-) Zellen sein, um dem apoptotischen Programm in GC-B-Zellen ohne funktionellen BCR zu entkommen (Schwering et al., 2003a). Da L&H-Zellen jedoch funktionelle BCR ausprägen, scheint dieses Konzept für NLPHL unwahrscheinlich. Zudem prägen L&H-Zellen noch viele Gene in immunhistochemisch nachweisbarem Maße aus und sind eng mit normalen Keimzentramsstrukturen assoziiert, was auf eine Interaktion mit dem Mikromilieu wie der von normalen GC-B-Zellen hindeutet. Daher scheinen (einige) B-Zellfunktionen noch für das Überleben und die Proliferation der L&H-Zellen wichtig zu

sein. Vielleicht ist die verminderte Expression und/oder Funktion der B-Zellmarker in L&H-Zellen ein Nebeneffekt eines bislang unbekannten transformierenden Ereignisses in diesen Zellen. In der Tat konnten für PAX5 kürzlich Mutationen in L&H-Zellen beschrieben werden, deren funktionelle Konsequenzen allerdings noch nicht geklärt sind (Liso et al., 2006).

4.3.5 Identifizierung L&H-Zell-spezifischer Gene

Im Vergleich von L&H-Zellen mit normalen B-Zellen und B-NHL wurden 49 Gene identifiziert, die spezifisch in L&H-Zellen hochreguliert waren. Mittels Immunhistochemie wurde die Proteinexpression von MMP12, CTSB und EOMES in L&H-Zellen primärer NLPHL nachgewiesen und somit die Microarray-Daten bestätigt. Diese dereguliert ausgeprägten Gene könnten interessante neue diagnostische Marker darstellen und könnten von speziellem Interesse für die Pathogenese des NLPHL sein. Protein Kinase C zeta ist involviert in Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung sowie in der Aktivierung von NF- κ B (Dallot et al., 2005). Der KISS1-Rezeptor aktiviert die ERK-Signaltransduktion (Ringel et al., 2002). Hohe Mengen an Ubiquitin D (UBD) erhöhen mitotische Nondisjunction und chromosomale Instabilität und könnten somit zu chromosomalen Aberrationen im NLPHL beitragen.

4.3.6 L&H-Zellen deregulieren Apoptose-Regulatoren

L&H-Zellen weisen eine erhöhte Expression von Genen auf, die anti-apoptotische Moleküle kodieren sowie eine Runterregulation vieler pro-apoptotischer Gene. Zudem haben L&H-Zellen verschiedene Mechanismen erworben, um der Immunüberwachung durch T- und NK-Zellen zu entgehen. Dieses Muster ist nicht nur ein Charakteristikum der L&H-Zellen im Vergleich zu apoptose-geneigten GC-B-Zellen, sondern auch im Vergleich zu anderen normalen B-Zellsubpopulationen und deutet somit auf eine tumorspezifische Deregulation von Apoptose-regulierenden Molekülen hin (Abb. 18). Interessanterweise zeigen HRS-Zellen und die meisten TCRBL und DLBCL ein ähnliches Expressionsmuster von pro- und anti-apoptotischen Genen wie die L&H-Zellen. Dies deutet auf einen ähnlichen pathogenen Mechanismus der Apoptose zu entkommen in NLPHL, cHL, TCRBL und einigen DLBCL hin und unterstreicht weiter die Ähnlichkeiten dieser Erkrankungen.

4.3.7 L&H-Zellen sind durch eine starke NF- κ B-Aktivität charakterisiert

Konstitutive NF- κ B-Aktivität ist an deregulierter Proliferation, maligner Transformation und Apoptose-Resistenz in einer Vielzahl von Tumoren - einschließlich cHL - beteiligt (Perkins, 2007). In früheren Studien konnte aktives RelA in einer kleinen Zahl von NLPHL-Fällen in L&H-Zellen nachgewiesen werden (Izban et al., 2001). cREL wurde nur in 3/15 NLPHL nachgewiesen (Rodig et al., 2005). Diese Studien untersuchten nicht, ob diese NF- κ B Faktoren auch die Expression von NF- κ B-Zielgenen zur Folge hatte. Um diese Frage zu klären, wurde die Expression eines umfassenden Sets von NF- κ B-Zielgenen

in L&H-Zellen analysiert. Diese Analyse ergab, dass die NF- κ B-Zielgene in L&H-Zellen mindestens so stark wie in HRS-Zellen ausgeprägt werden (Abb. 19). Starke Immunfärbung für die aktive Form der p65 NF- κ B-Untereinheit in L&H-Zellen in 19/19 NLP HL (Abb. 21a) bekräftigte weiter die konstitutive Aktivität von NF- κ B in L&H-Zellen.

Der Mechanismus, der dieser starken NF- κ B-Aktivität in L&H-Zellen unterliegt, ist bisher nicht geklärt. Genomische Zugewinne des *REL* Gens, wie es häufig im cHL der Fall ist, sind vermutlich nicht beteiligt, da L&H-Zellen nur selten aktives c-REL aufweisen (Rodig et al., 2005). Ein Beitrag durch EBV, wie im cHL, spielt im NLP HL keine Rolle, da L&H-Zellen so gut wie nie EBV-infiziert sind. Bemerkenswerterweise sind, entgegen den um die HRS-Zellen rosettierenden CD40L-ausprägenden T-Zellen, die NF- κ B-Aktivierung durch Stimulation von CD40 auf den HRS-Zellen auslösen können, die T-Zellen, die Rosetten um L&H-Zellen bilden, nicht positiv für den CD40L, was eine Beteiligung dieses Signalweges in L&H-Zellen ebenso unwahrscheinlich macht (Carbone et al., 1995). Ob inaktivierende Mutationen in $I\kappa B\alpha$ oder $I\kappa B\epsilon$ Genen - wie im cHL - an der Pathogenese des NLP HL beteiligt sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

4.3.8 ERK-Aktivierung spielt zumindest in einem Teil der NLP HL-Fälle eine Rolle

Der häufige Nachweis von aktivem p-ERK zusammen mit der erhöhten Expression zahlreicher ERK-aktivierender Gene sowie ERK-Zielgene spricht für eine deregulierte Aktivität des ERK-Signalweges in L&H-Zellen. Dieser Signalweg steht mit maligner Transformation und Regulation von zellulärem Wachstum und Proliferation in Zusammenhang und könnte somit zur Pathogenese des NLP HL beitragen. Außer den in der Analyse in L&H-Zellen identifizierten ERK-aktivierenden Genen (*KISS1R*, *LGALS1*, *CHI3L1*, *SLAMF7*, *SCDBP*) sind die Mechanismen, die zur ERK-Aktivierung führen, unklar. Stimulation von CD30, CD40 oder RANK - als klassischer Weg der Aktivierung von ERK im cHL - ist in L&H-Zellen unwahrscheinlich. Die L&H-Zellen prägen kein CD30 oder RANK aus. L&H-Zellen prägen zwar CD40 aus, die rosettierenden T-Zellen sind jedoch negativ für CD40L. Somit ist die ERK-Aktivierung durch Stimulation von CD40 auf den L&H-Zellen ebenso unwahrscheinlich. Allerdings könnte die aberrante Expression und Aktivierung von RTK in L&H-Zellen (Renné et al., 2005b), wenn auch nicht so stark wie in HRS-Zellen, ein zusätzlicher Mechanismus zur ERK-Aktivierung sein.

4.3.9 Extrazelluläre Matrix (ECM) Degradation und *tissue remodeling*

In B-NHL korreliert das Ausmaß der Expression von ECM-degradierenden Molekülen mit der klinischen Aggressivität der Lymphome (Kossakowska et al., 1998). Das NLP HL ist ein eher indolentes, wenig aggressives Lymphom. Nur etwa 3-5% der NLP HL weisen im späteren Krankheitsverlauf eine Progression zu aggressiven *high-grade* Lymphomen, wie dem DLBCL, auf (Jaffe et al., 2001). Welche Mechanismen zur verstärkten Expression vieler ECM-degradierender Moleküle in L&H-Zellen führen, ist bislang nicht klar. Die

Hochregulation einiger dieser Gene (Cathepsin B und L, MMP9, PLA2, CHI3L1, CD44) könnte ein Effekt der NF- κ B-Aktivität in L&H-Zellen sein. Die Anzahl der ECM-degradierenden Moleküle und die Höhe ihrer Expression implizieren, dass ECM Degradation und *tissue remodeling* eine Rolle in der Pathogenese des NLPHL spielen. Dennoch könnten andere Funktionen dieser Gene, beispielsweise in der Inhibierung von Apoptose, der Erschaffung eines immunsupprimierenden Mikromilieus sowie der Förderung von Zellwachstum (Egeblad und Werb, 2002; Mohamed und Sloane, 2006), eine wichtigere Rolle in der Pathogenese spielen. Einige dieser Gene, z.B. MMP9 und CTSB, könnten zukünftig therapeutische Ziele darstellen.

4.3.10 Implikationen für die Pathogenese, Therapie und Diagnose des NLPHL

Durch die vorliegende Arbeit ergaben sich neue Einblicke in die Natur und in die Pathogenese der L&H-Zellen des NLPHL. Obwohl sich L&H-Zellen GC-B-Zellen klar in vielen phänotypischen und genetischen Aspekten gleichen, deutet ihr Genexpressionsprofil darauf hin, dass L&H-Zellen von transformierten späten GC-B-Zellen im Differenzierungsprozess zu Gedächtnis-B-Zellen abstammen. Es konnten einige pathogenetische Mechanismen identifiziert werden, einschließlich einer starken konstitutiven NF- κ B-Aktivität und Aktivierung der ERK-Signaltransduktion. Aktivierung des ERK-Signalweges ist kritisch für eine große Zahl von Ras-induzierten zellulären Antworten und hat Einfluss auf die Pathogenese zahlreicher Krebserkrankungen. Die aberrante Aktivierung in L&H-Zellen war bislang unbekannt und könnte von pathogener Relevanz sein. Eine Reihe pharmakologischer Agenzien, die NF- κ B oder ERK inhibieren, werden derzeit klinisch getestet und könnten für die Therapie des NLPHL verwendbar werden. Weitere pathogenetische Mechanismen beinhalten die Unterdrückung von Apoptose und die Erschaffung eines immunsupprimierenden Mikromilieus um der Immunüberwachung zu entkommen. Die Rolle der Gene, die als speziell in L&H-Zellen dereguliert hervorgetreten sind, benötigt weitergehende Analysen.

Da HRS- und L&H-Zellen einige Unterschiede in immunhistochemischen Analysen zeigten (Hansmann et al., 1999; Küppers, 2002; Küppers und Re, 2007), scheint die enge Verwandtschaft bezüglich ihres Genexpressionsprofils überraschend. Ähnlichkeiten zwischen diesen Tumorzellen umfassen die konstitutive NF- κ B-Aktivität und ERK-Signaltransduktion, was darauf hindeutet, dass NLPHL und cHL ähnliche pathogenetische Mechanismen teilen. Diese Hypothese wird auch durch die kürzlich identifizierten inaktivierenden SOCS1-Mutationen, aberrante Expression und Aktivierung von RTK und des JAK/STAT-Signalweges sowie der aberranten somatischen Hypermutation von Proto-Onkogenen in Tumorzellen beider Entitäten unterstützt (Baus und Pfitzner, 2006; Hinz et al., 2002; Kube et al., 2001; Liso et al., 2006; Mottok et al., 2007; Renné et al., 2005b; Skinnider et al., 2002; Weniger et al., 2005). Die Genexpressionsprofile von HRS- und L&H-Zellen ähneln einander auch durch die Runterregulation B-Linien-spezifischer Gene,

auch wenn diese Eigenschaft in L&H-Zellen nicht so stark ausgeprägt ist wie in HRS-Zellen. Es stellte sich heraus, dass L&H-Zellen sogar in Bezug auf die Genexpression noch etwas ähnlicher zu den Lymphomzellen des TCRBL (und einer Untergruppe von DLBCL) sind. Da die Unterscheidung von NLP HL und TCRBL aber klinisch sehr wichtig ist (Abramson, 2006), könnten die in dieser Analyse identifizierten Gene, die zwischen L&H-Zellen und TCRBL differentiell ausgeprägt werden, wertvolle Marker für die Differentialdiagnose von NLP HL und TCRBL werden.

4.4 Ausblick

In dieser Genexpressionsanalyse wurden Gene identifiziert, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des NLP HL spielen könnten. Um die Relevanz dieser Gene für die Pathogenese zu überprüfen, sind funktionelle Analysen notwendig. Zum einen könnte die Funktion von Genen (z.B. L&H-spezifischer Gene) in der Zelllinie DEV mittels siRNA inhibiert werden. Jedoch besteht hierbei die Schwierigkeit, dass nur eine einzige Zelllinie existiert, die (vermutlich) von einem Patienten abstammt, der an NLP HL erkrankt war und somit generelle Aussagen schwer zu treffen sind. Zum anderen könnte man auch durch die ektoische aberrante Expression dieser Gene in LCL Zelllinien Rückschlüsse auf deren Funktion in L&H-Zellen ziehen.

Die Relevanz einiger differentialdiagnostischer Marker (NLP HL vs cHL bzw. NLP HL vs TCRBL) sollte durch weitere immunhistochemische Analysen untersucht werden. Es wurde bereits versucht ENPP2 (Autotaxin), einen der potentiellen differentialdiagnostischen Marker zwischen NLP HL und TCRBL, zu validieren. Es konnte jedoch mit verschiedenen Antikörpern keine spezifische Färbung etabliert werden.

Eines der wahrscheinlich interessantesten Ergebnisse in der Analyse der Pathogenese des NLP HL ist die konstitutive NF- κ B-Aktivität in L&H-Zellen. Wie bereits in Kapitel 4.3.7 diskutiert sind REL-Amplifikationen, CD40/CD40L Interaktionen oder eine EBV-Infektion der L&H-Zellen als Ursache der starken NF- κ B-Aktivität eher unwahrscheinlich. Daher sollte untersucht werden, ob inaktivierende Mutationen in I κ B α - oder I κ B ϵ -Genen (wie im cHL) an der Pathogenese des NLP HL beteiligt sind. Zudem haben Arbeiten von Roland Schmitz (Institut für Zellbiologie und Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen) ergeben, dass in HRS-Zellen inaktivierende Mutation im A20-Gen (Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung) vorliegen. Erstaunlicherweise sind von diesen Mutationen hauptsächlich EBV-negative cHL betroffen, so dass die Inaktivierung von A20 ein pathogener Mechanismus speziell in EBV-negativen cHL darstellen könnte. Da die L&H-Zellen des NLP HL ebenfalls EBV-negativ sind, ist es interessant zu untersuchen, ob L&H-Zellen inaktivierende Mutation im A20 Gen aufweisen. Für I κ B α , I κ B ϵ und A20 sind bereits PCR-Protokolle in der Arbeitsgruppe von Prof. Küppers etabliert. In Kapitel 3.3.6.1 ist erwähnt, dass L&H-Zellen die beiden Liganden des BAFF/BAFF-Rezeptor Systems, nämlich BAFF und APRIL, aberrant ausdrücken. Aus der Literatur ist bekannt, dass der BAFF-R (BR3) nicht von L&H-Zellen

ausgeprägt wird. Da die Aktivierung der BAFF-Rezeptoren durch die Liganden BAFF oder APRIL ein Überlebenssignal vermittelt, das auch zur Aktivierung von NF- κ B führt, soll die Expression der beiden anderen BAFF-Rezeptoren TACI und BCMA in L&H-Zellen überprüft werden. Für BCMA und TACI wurden schon je zwei verschiedene immunhistochemische Antikörper getestet, es konnte jedoch keine spezifische Färbung etabliert werden. Zurzeit werden in Zusammenarbeit mit der Firma ZytoVision Oligonukleotid-Sonden entwickelt, die spezifisch für die TACI- bzw. BCMA-kodierende mRNA sind. Das Vorhandensein dieser mRNA wird dann durch Chromogene *in situ* Hybridisierung (CISH) nachgewiesen. Sobald diese Sonden erfolgreich etabliert sind werden L&H-Zellen primärer NLPHL-Fälle mittels dieser Methode analysiert werden.

5. Zusammenfassung

Das Hodgkin-Lymphom (HL), eines der häufigsten malignen Lymphome, umfasst zwei Entitäten, das klassische HL (cHL) und das noduläre lymphozyten-prädominante HL (NLPHL). Die Tumorzellen – Hodgkin-Reed/Sternberg (HRS) Zellen des cHL und die „*lymphocytic & histiocytic*“ (L&H) Zellen des NLPHL – repräsentieren üblicherweise weniger als 1% der Zellen im Tumor, verstreut in einem inflammatorischen zellulären Hintergrund. Die Tumorzellen beider Entitäten stammen von Keimzentrum-(GC)-B-Zellen ab, sind aber genetisch, morphologisch und phänotypisch unterschiedlich. Die Pathogenese des NLPHL und seine Verwandtschaft zu anderen Lymphomen sind weitestgehend unbekannt. Dies liegt zum Teil in der technischen Herausforderung begründet, diese seltenen neoplastischen L&H-Zellen zu analysieren und daher ist bislang keine systematische Genexpressionsstudie von L&H-Zellen im großen Rahmen durchgeführt worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine verlässliche Methode zur Lasermikrodissektion primärer L&H-Zellen aus Gefrierschnitten, die RNA-Isolation aus diesen Zellen und die Analyse ihrer globalen Genexpression nach einer 2-Runden *in vitro* Transkription im Vergleich zu normalen und anderen malignen B-Zellen erfolgreich etabliert werden. Diese genomweite Expressionsanalyse ergab wichtige neue Einsichten in die Natur und Pathogenese von L&H-Zellen des NLPHL. Obwohl L&H-Zellen klar GC-B-Zellen in vielen phänotypischen und genetischen Aspekten ähneln, scheint ihr Genexpressionsprofil sie am Übergang von GC-B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen zu platzieren. Mehrere pathogenetische Mechanismen konnten im NLPHL identifiziert werden, einschließlich der starken NF- κ B-Aktivität und der Aktivierung des ERK-Signalweges. Die Aktivierung dieser Signalwege steht in Verbindung mit der Pathogenese vieler Krebserkrankungen. Ihre aberrante Aktivierung in L&H-Zellen war bislang unbekannt und könnte von pathogener Relevanz sein und zu neuen therapeutischen Strategien führen. Weitere pathogenetische Mechanismen beinhalten die Unterdrückung von Apoptose und die Kreierung eines immunsupprimierenden Mikromilieus um der Immunüberwachung zu entkommen. Die Rolle anderer Gene, die sich als spezifisch in L&H-Zellen dereguliert erwiesen, muss noch weitergehend untersucht werden. Da HRS- und L&H-Zellen markante Unterschiede in immunhistochemischen Analysen zeigen, war ihre enge Verwandtschaft bezüglich ihres Genexpressionsprofils überraschend. Die Ähnlichkeiten dieser Tumorzellen schließen die konstitutive NF- κ B-Aktivität und ERK-Signaltransduktion ein, was nahe legt, dass NLPHL und cHL ähnliche pathogenetische Mechanismen teilen. Die Genexpressionsprofile von HRS- und L&H-Zellen ähneln sich auch in Bezug auf die Runterregulation von B-Zellmarkern, obwohl dieses Ereignis in L&H-Zellen nicht so schwerwiegend wie in HRS-Zellen ist. L&H-Zellen zeigten bezüglich ihrer Genexpression sogar noch größere Ähnlichkeit zu TCRBL (und einer Untergruppe von DLBCL). Da die Unterscheidung von NLPHL und TCRBL jedoch klinisch wichtig ist, könnten die Gene, die zwischen L&H-Zellen und den Lymphomzellen des TCRBL unterscheiden, wertvolle Marker für die Differentialdiagnose von NLPHL und TCRBL werden.

Abstract

Hodgkin lymphoma (HL), one of the most common malignant lymphomas, comprises two entities, classical HL (cHL) and nodular lymphocyte-predominant HL (NLPHL). The tumor cells - Hodgkin and Reed/Sternberg (HRS) cells in cHL and "lymphocytic and histiocytic" (L&H) cells in NLPHL - usually represent less than 1% of cells in the tumor, being dispersed in a prominent inflammatory cellular background. Tumor cells of both entities are derived from germinal center (GC) B cells, but they are genetically, morphologically and phenotypically different. The pathogenesis of NLPHL and its relationship to other lymphomas are largely unknown. This is partly due to the technical challenge of analyzing its rare neoplastic L&H cells and therefore, no systematic large-scale gene expression study of L&H cells has been performed so far.

In the present study, a reliable method to lasermicrodissect primary L&H cells from frozen tissue sections, isolate RNA from the cells and analyse their global gene expression after a two-round in vitro transcription in comparison to normal and other malignant B cells was successfully established. This genome-wide expression analysis revealed important novel insights into the nature and pathogenesis of the L&H cells in NLPHL. Although L&H cells clearly resemble GC B cells in many phenotypic and genetic aspects, their gene expression profile seems to place them at the transition of GC B cells to memory B cells. Several pathogenetic mechanisms were identified in NLPHL, including strong constitutive activity of NF- κ B and activation of the ERK signaling pathway. Activation of these pathways has been implicated in the pathogenesis of several cancers. Their aberrant activation in L&H cells was previously unknown and might be of pathogenic relevance and could lead to novel therapeutic strategies. Further pathogenetic mechanisms in NLPHL involve the suppression of apoptosis and the creation of an immunosuppressive environment to escape from immune surveillance. The role of other genes which emerged to be specifically deregulated in L&H cells requires to be further investigated. Since HRS and L&H cells show marked differences at immunohistochemical analysis, their close relatedness in terms of gene expression profile appears surprising. Similarities among these tumor cells include constitutive NF- κ B activity and ERK signaling, which suggest NLPHL and cHL may share similar pathogenetic mechanisms. The gene expression profile of HRS and L&H cells also resemble each another because of downregulation of B lineage-specific genes, although this event is not as severe in L&H cells as in HRS cells. L&H cells turned out to be even more similar to TCRBL (and a subset of DLBCL) in terms of gene expression. As the distinction between NLPHL and TCRBL is, however, clinically important, the genes discriminating between L&H cells and TCRBL identified here may become valuable markers for the differential diagnosis of NLPHL and TCRBL.

6. Literatur

- Aarli, A., Skeie Jensen, T., Kristoffersen, E.K., Bakke, A., und Ulvestad, E. (1997). Inhibition of phytohaemagglutinin-induced lymphoproliferation by soluble annexin II in sera from patients with renal cell carcinoma. *Ap-
mis* 105, 699-704.
- Abramson, J.S. (2006). T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. *Oncologist* 11, 384-392.
- Achten, R., Verhoef, G., Vanuytsel, L., und De Wolf-Peeters, C. (2002). T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity. *J Clin Oncol* 20, 1269-1277.
- Alber, G., Kim, K.M., Weiser, P., Riesterer, C., Carsetti, R., und Reth, M. (1993). Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus. *Curr Biol* 3, 333-339.
- Alfano, D., Franco, P., Vocca, I., Gambi, N., Pisa, V., Mancini, A., Caputi, M., Carriero, M.V., Iaccarino, I., und Stoppelli, M.P. (2005). The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 93, 205-211.
- Algara, P., Martinez, P., Sanchez, L., Villuendas, R., Orradre, J.L., Oliva, H., und Piris, M.A. (1991). Lymphocyte predominance Hodgkin's disease (nodular paragranuloma)--a bcl-2 negative germinal centre lymphoma. *Histopathology* 19, 69-75.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Alt, F.W., und Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4118-4122.
- Alt, F.W., Blackwell, T.K., und Yancopoulos, G.D. (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238, 1079-1087.
- Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G., und Stein, H. (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 74, 810-816.
- Armitage, J.O., und Weisenburger, D.D. (1998). New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16, 2780-2795.
- Armstrong, A.A., Shield, L., Gallagher, A., und Jarrett, R.F. (1998). Lack of involvement of known oncogenic DNA viruses in Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 77, 1045-1047.
- Atayar, C., Poppema, S., Blokzijl, T., Harms, G., Boot, M., und van den Berg, A. (2005). Expression of the T-cell transcription factors, GATA-3 and T-bet, in the neoplastic cells of Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol* 166, 127-134.
- Atayar, C., Kok, K., Kluiver, J., Bosga, A., van den Berg, E., van der Vlies, P., Blokzijl, T., Harms, G., Davelaar, I., Sikkema-Raddatz, B., et al. (2006). BCL6 alternative breakpoint region break and homozygous deletion of 17q24 in the nodular lymphocyte predominance type of Hodgkin's lymphoma-derived cell line DEV. *Hum Pathol* 37, 675-683.
- Baddoura, F.K., Chan, W.C., Masih, A.S., Mitchell, D., Sun, N.C., und Weisenburger, D.D. (1995). T-cell-rich B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of eight cases. *Am J Clin Pathol* 103, 65-75.
- Bahler, D.W., und Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6770-6774.
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., und Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 196, 493-503.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., et al. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-2969.
- Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G.A., Tu, Y., Califano, A., Cattoretto, G., und Dalla-Favera, R. (2004). Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* 104, 4088-4096.

- Bastion, Y., Sebban, C., Berger, F., Felman, P., Salles, G., Dumontet, C., Bryon, P.A., und Coiffier, B. (1997). Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 15, 1587-1594.
- Baus, D., und Pfitzner, E. (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer* 118, 1404-1413.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C., und Küppers, R. (2005). Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106, 4345-4350.
- Benharroch, D., Shemer-Avni, Y., Levy, A., Myint, Y.Y., Ariad, S., Rager, B., Sacks, M., und Gopas, J. (2003). New candidate virus in association with Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 44, 605-610.
- Blume-Jensen, P., und Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Böhm, M., Wieland, I., Schütze, K., und Rübben, H. (1997). Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am J Pathol* 151, 63-67.
- Bonizzi, G., und Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- Bouchon, A., Cella, M., Grierson, H.L., Cohen, J.I., und Colonna, M. (2001). Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 167, 5517-5521.
- Boudová, L., Torlakovic, E., Delabie, J., Reimer, P., Pfistner, B., Wiedenmann, S., Diehl, V., Müller-Hermelink, H.K., und Rüdiger, T. (2003). Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with nodules resembling T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: differential diagnosis between nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma and T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma. *Blood* 102, 3753-3758.
- Boukerche, H., Su, Z.Z., Emdad, L., Baril, P., Balme, B., Thomas, L., Randolph, A., Valerie, K., Sarkar, D., und Fisher, P.B. (2005). mda-9/Syntenin: a positive regulator of melanoma metastasis. *Cancer Res* 65, 10901-10911.
- Braeuninger, A., Küppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.H., Rajewsky, K., und Hansmann, M.L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9337-9342.
- Bräuninger, A., Hansmann, M.L., Strickler, J.G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1999a). Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 340, 1239-1247.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Speiker, T., Siebert, R., Strickler, J.G., Schlegelberger, B., Rajewsky, K., und Hansmann, M.L. (1999b). Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood* 93, 2679-2687.
- Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M.L., und Küppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 118, 1853-1861.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., und Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13, 589-597.
- Burgemeister, R., Minderer, S., Gloning, K.-P., und Schütze, K. (1999). Single Fetal Cells Separated by the Laser MicroBeam Technique. *Bioforum Internat* 3, 119-121.
- Burke, J.S. (1992). Hodgkin's Disease: Histopathology and Differential Diagnosis. (Baltimore: Williams and Wilkins).
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22, 55-79.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., und Hay, R.T. (1999). Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. *Oncogene* 18, 3063-3070.
- Camilleri-Broet, S., Molina, T., Audouin, J., Tourneau, A.L., und Diebold, J. (1996). Morphological variability of tumour cells in T-cell-rich B-cell lymphoma. A histopathological study of 14 cases. *Virchows Arch* 429, 243-248.
- Carbone, A., Gloghini, A., Gruss, H.J., und Pinto, A. (1995). CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 147, 912-922.

- Carbone, A., Gloghini, A., Gattei, V., Degan, M., Improta, S., Aldinucci, D., Canzonieri, V., Perin, T., Volpe, R., Gaidano, G., et al. (1997). Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease react with the plasma cell-specific monoclonal antibody B-B4 and express human syndecan-1. *Blood* 89, 3787-3794.
- Carbone, A., Gloghini, A., Gaidano, G., Franceschi, S., Capello, D., Drexler, H.G., Falini, B., und Dalla-Favera, R. (1998). Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood* 92, 2220-2228.
- Chaganti, S., Bell, A.I., Pastor, N.B., Milner, A.E., Drayson, M., Gordon, J., und Rickinson, A.B. (2005). Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 106, 4249-4252.
- Chandler, D.P., Wagnon, C.A., und Bolton, H., Jr. (1998). Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 64, 669-677.
- Chapman, C.J., Wright, D., und Stevenson, F.K. (1998). Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis. *Leuk Lymphoma* 30, 257-267.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., und Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463-470.
- Coiffier, B. (2001). Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 13, 325-334.
- Creagh, E.M., Conroy, H., und Martin, S.J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 193, 10-21.
- Dallot, E., Mehats, C., Oger, S., Leroy, M.J., und Breuiller-Fouche, M. (2005). A role for PKC ζ in the LPS-induced translocation NF-kappaB p65 subunit in cultured myometrial cells. *Biochimie* 87, 513-521.
- Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Grogan, T.M., et al. (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351, 2159-2169.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354, 2431-2442.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., und Staudt, L.M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194, 1861-1874.
- De Jong, D., Van Gorp, J., Sie-Go, D., und Van Heerde, P. (1996). T-cell rich b-cell non-hodgkin's lymphoma: a progressed form of follicle centre cell lymphoma and lymphocyte predominance hodgkin's disease. *Histopathology* 28, 15-24.
- Delabie, J., Shipman, R., Bruggen, J., De Strooper, B., van Leuven, F., Tarcsay, L., Cerletti, N., Odink, K., Diehl, V., Bilbe, G., et al. (1992). Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 80, 2891-2896.
- Doerr, J.R., Malone, C.S., Fike, F.M., Gordon, M.S., Soghomonian, S.V., Thomas, R.K., Tao, Q., Murray, P.G., Diehl, V., Teitell, M.A., et al. (2005). Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol* 350, 631-640.
- Dogan, A., Bagdi, E., Munson, P., und Isaacson, P.G. (2000). CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 24, 846-852.
- Dorreen, M.S., Habeshaw, J.A., Stansfeld, A.G., Wrigley, P.F., und Lister, T.A. (1984). Characteristics of Sternberg-Reed, and related cells in Hodgkin's disease: an immunohistological study. *Br J Cancer* 49, 465-476.
- Drexler, H.G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma* 8, 283-313.
- Drexler, H.G. (1993). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 9, 1-25.
- Drosopoulos, K.G., Roberts, M.L., Cermak, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Andera, L., und Pintzas, A. (2005). Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 22856-22867.
- Dutton, A., O'Neil, J.D., Milner, A.E., Reynolds, G.M., Starczynski, J., Crocker, J., Young, L.S., und Murray, P.G. (2004). Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6611-6616.

- Dutton, A., Reynolds, G.M., Dawson, C.W., Young, L.S., und Murray, P.G. (2005). Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol* 205, 498-506.
- Dürkop, H., Hirsch, B., Hahn, C., Foss, H.D., und Stein, H. (2003). Differential expression and function of A20 and TRAF1 in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and their induction by CD30 stimulation. *J Pathol* 200, 229-239.
- Eclache, V., Magnac, C., Pritsch, O., Delecluse, H.J., Davi, F., Raphael, M., und Dighiero, G. (1996). Complete nucleotide sequence of Ig V genes in three cases of Burkitt lymphoma associated with AIDS. *Leuk Lymphoma* 20, 281-290.
- Egeblad, M., und Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., et al. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94, 3129-3134.
- Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haefliger, A., Vry, M.S., Döhner, K., Bommert, K., Stein, H., und Dörken, B. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 201, 413-420.
- Falini, B., Bigerna, B., Pasqualucci, L., Fizzotti, M., Martelli, M.F., Pileri, S., Pinto, A., Carbone, A., Venturi, S., Pacini, R., et al. (1996). Distinctive expression pattern of the BCL-6 protein in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Blood* 87, 465-471.
- Felgar, R.E., Macon, W.R., Kinney, M.C., Roberts, S., Pasha, T., und Salhany, K.E. (1997). TIA-1 expression in lymphoid neoplasms. Identification of subsets with cytotoxic T lymphocyte or natural killer cell differentiation. *Am J Pathol* 150, 1893-1900.
- Fink, L., und Bohle, R.M. (1999). mRNA-Analysen nach Laser-assistiertem Zell-Picking aus komplexen Geweben. *Biospektrum* 5, 414-417.
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., und Stamenkovic, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21, 5213-5223.
- Fisher, R.I. (2003). Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol* 30, 3-9.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., und Jaatela, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153, 999-1010.
- Foss, H.D., Anagnostopoulos, I., Araujo, I., Assaf, C., Demel, G., Kummer, J.A., Hummel, M., und Stein, H. (1996). Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 88, 4005-4011.
- Foss, H.D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., und Stein, H. (1999). Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 94, 3108-3113.
- Franke, S., Wlodarska, I., Maes, B., Vandenberghe, P., Delabie, J., Hagemeijer, A., und De Wolf-Peeters, C. (2001). Lymphocyte predominance Hodgkin disease is characterized by recurrent genomic imbalances. *Blood* 97, 1845-1853.
- Franke, S., Wlodarska, I., Maes, B., Vandenberghe, P., Achten, R., Hagemeijer, A., und De Wolf-Peeters, C. (2002). Comparative genomic hybridization pattern distinguishes T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma from nodular lymphocyte predominance Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 161, 1861-1867.
- Freedman, A.S., Saporito, L., Rhynhart, K., Morimoto, C., und Nadler, L.M. (1994). Adhesion of follicular lymphoma cells to lymphoid germinal centers--a potential mechanism of tumor cell homing following autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 13, 47-52.
- Frias, M.A., Rebsamen, M.C., Gerber-Wicht, C., und Lang, U. (2007). Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 73, 57-65.
- Gaidano, G., Pasqualucci, L., Capello, D., Berra, E., Deambroggi, C., Rossi, D., Maria Larocca, L., Ghoghini, A., Carbone, A., und Dalla-Favera, R. (2003). Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 1833-1841.

- Garcia, J.F., Camacho, F.I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., Flores, T., et al. (2003). Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 101, 681-689.
- Gatter, K.C., und Warnke, R.A. (2001). Diffuse large B-cell lymphoma. In *World Health organization Classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein und J.W. Vardiman, eds. (Lyon: IARC Press), pp. 171-174.
- Gaulard, P., d'Agay, M.F., Peuchmaur, M., Brousse, N., Gisselbrecht, C., Solal-Celigny, P., Diebold, J., und Mason, D.Y. (1992). Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 140, 1089-1095.
- Geisberger, R., Cramer, R., und Achatz, G. (2003). Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Immunology* 110, 401-410.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, R80.
- Georgakis, G.V., Li, Y., Rassidakis, G.Z., Medeiros, J.L., Mills, G.B., und Younes, A. (2004). Differential effects of three small molecules blocking phosphatidylinositol-3 kinase or AKT in Hodgkin disease cell lines: Induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Blood* 104(suppl):125a. Abstract.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., und Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., und Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* 16, 6131-6140.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., und Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* 18, 3064-3073.
- Glaser, S.L., und Jarrett, R.F. (1996). The epidemiology of Hodgkin's disease. *Baillieres Clin Haematol* 9, 401-416.
- Gold, M.R. (2002). To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. *Trends Pharmacol Sci* 23, 316-324.
- Good, K.L., Bryant, V.L., und Tangye, S.G. (2006). Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 177, 5236-5247.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-682.
- Goossens, T., Klein, U., und Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2463-2468.
- Gravel, S., Delsol, G., und Al Saati, T. (1998). Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this translocation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 91, 2866-2874.
- Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E., und Niedobitek, G. (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 205, 541-547.
- Grufferman, S., und Delzell, E. (1984). Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiol Rev* 6, 76-106.
- Gutensohn, N., und Cole, P. (1980). Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin Oncol* 7, 92-102.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J.C., Rangel, R., und Martinez-Valdez, H. (2002). Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 107, 167-175.
- Haber, M.M., Liu, J., Knowles, D.M., und Inghirami, G. (1992). Determination of the DNA content of the Reed-Sternberg cell of Hodgkin's disease by image analysis. *Blood* 80, 2851-2857.
- Hansmann, M.-L., Weiss, L.M., Stein, H., Harris, N.L., und Jaffe, E.S. (1999). Pathology of lymphocyte predominance Hodgkin's disease. In *Hodgkin's disease*, P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl, R.T. Hoppe und L.M. Weiss, eds. (Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins), pp. 169-180.

- Hansmann, M.L., Godde-Salz, E., Hui, P.K., Müller-Hermelink, H.K., und Lennert, K. (1986). Cytogenetic findings in nodular paraneoplasia (Hodgkin's disease with lymphocytic predominance; nodular) and in progressively transformed germinal centers. *Cancer Genet Cytogenet* 21, 319-325.
- Harris, N.L., und Ferry, J.A. (1992). Follicular lymphoma and related disorders (germinal center lymphomas (Baltimore, MD: Williams and Wilkins).
- Harris, N.L. (1999). Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol* 36, 220-232.
- Hecht, J.L., und Aster, J.C. (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3707-3721.
- Henle, G., Henle, W., und Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59, 94-101.
- Herbst, H., Samol, J., Foss, H.D., Raff, T., und Niedobitek, G. (1997). Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. *J Pathol* 182, 299-306.
- Hilger, R.A., Scheulen, M.E., und Strumberg, D. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511-518.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dörken, B., Zenke, M., Stein, H., und Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 196, 605-617.
- Hochberg, Y., und Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9, 811-818.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 17, 68-114.
- Holtick, U., Vockerodt, M., Pinkert, D., Schoof, N., Stürzenhofecker, B., Kussebi, N., Lauber, K., Wesselborg, S., Löffler, D., Horn, F., et al. (2005). STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrosine kinase AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia* 19, 936-944.
- Horning, S.J. (2000). Follicular lymphoma: have we made any progress? *Ann Oncol* 11 Suppl 1, 23-27.
- Huang, G., Yan, Q., Wang, Z., Chen, X., Zhang, X., Guo, Y., und Li, J.J. (2002b). Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Int J Oncol* 21, 31-36.
- Huang, J.Z., Sanger, W.G., Greiner, T.C., Staudt, L.M., Weisenburger, D.D., Pickering, D.L., Lynch, J.C., Armitage, J.O., Warnke, R.A., Alizadeh, A.A., et al. (2002). The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99, 2285-2290.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., und Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S96-104.
- Hummel, M., Marafioti, T., Ziemann, K., und Stein, H. (1996). Ig rearrangements in isolated Reed-Sternberg cells: conclusions from four different studies. *Ann Oncol* 7 Suppl 4, 31-33.
- Högerkorp, C.M., und Borrebaeck, C.A. (2006). The human CD77- B cell population represents a heterogeneous subset of cells comprising centroblasts, centrocytes, and plasmablasts, prompting phenotypical revision. *J Immunol* 177, 4341-4349.
- Ihle, J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13, 211-217.
- Illarregui, J.M., Bianco, G.A., Toscano, M.A., und Rabinovich, G.A. (2005). The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4, iv96-103.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236-1244.
- Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Küppers, R., und Radbruch, A. (1998). Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10117-10122.
- Izban, K.F., Wrone-Smith, T., Hsi, E.D., Schnitzer, B., Quevedo, M.E., und Alkan, S. (1999). Characterization of the interleukin-1beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 154, 1439-1447.

- Izban, K.F., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.Z., Martinez, R.L., Schnitzer, B., Ni, H., Nickoloff, B.J., und Alkan, S. (2001). Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* 14, 297-310.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., und Vardiman, J.W. (2001). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue (Lyon, France: IARC Press).
- Jain, R., Roncella, S., Hashimoto, S., Carbone, A., Francia di Celle, P., Foa, R., Ferrarini, M., und Chiorazzi, N. (1994). A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma. *J Immunol* 153, 45-52.
- Janeway, C.A., und Travers, T. (1997). Immunobiology, 3rd Edition Edition (London: Current Biology Ltd.).
- Jarrett, R.F., und MacKenzie, J. (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36, 260-269.
- Johnson, P.W., Rohatiner, A.Z., Whelan, J.S., Price, C.G., Love, S., Lim, J., Matthews, J., Norton, A.J., Amess, J.A., und Lister, T.A. (1995). Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 13, 140-147.
- Joos, S., Küpper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Moller, P., Pfreundschuh, M., Trümper, L., et al. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* 60, 549-552.
- Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trümper, L., Moller, P., Lichter, P., et al. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 99, 1381-1387.
- Jox, A., Zander, T., Küppers, R., Irsch, J., Kanzler, H., Kornacker, M., Bohlen, H., Diehl, V., und Wolf, J. (1999). Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells. *Blood* 93, 3964-3972.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H., und Dörken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99, 3398-3403.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* 191, 395-402.
- Kanavaros, P., Vlychou, M., Stefanaki, K., Rontogianni, D., Gaulard, P., Pantelidaki, E., Zois, M., Darivianaki, K., Georgoulas, V., Boulland, M.L., et al. (1999). Cytotoxic protein expression in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Anticancer Res* 19, 1209-1216.
- Kanzler, H., Hansmann, M.L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1996a). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* 87, 3429-3436.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1996b). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184, 1495-1505.
- Kapp, U., Yeh, W.C., Patterson, B., Elia, A.J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., Mirtsos, C., et al. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 189, 1939-1946.
- Kashkar, H., Krönke, M., und Jürgensmeier, J.M. (2002). Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 750-757.
- Kashkar, H., Haefs, C., Shin, H., Hamilton-Dutoit, S.J., Salvesen, G.S., Krönke, M., und Jürgensmeier, J.M. (2003). XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* 198, 341-347.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., und Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J* 16, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., und Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17, 1700-1709.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 162, 261-280.

- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., und Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2639-2644.
- Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., Kroesen, B.J., und van den Berg, A. (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* **207**, 243-249.
- Kocks, C., und Rajewsky, K. (1989). Stable Expression and Somatic Hypermutation of Antibody V Regions in B-Cell Developmental Pathways. *Ann Rev Immunol* **7**, 537-559.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., und Alt, F.W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171-1175.
- Kossakowska, A.E., Hinek, A., Edwards, D.R., Lim, M.S., Zhang, C.L., Breitman, D.R., Prusinkiewicz, C., Stabler, A.L., Urbanski, L.S., und Urbanski, S.J. (1998). Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* **152**, 565-576.
- Kovacic, B., Stoiber, D., Moriggl, R., Weisz, E., Ott, R.G., Kreibich, R., Levy, D.E., Beug, H., Freissmuth, M., und Sexl, V. (2006). STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development. *Cancer Cell* **10**, 77-87.
- Krenacs, L., Wellmann, A., Sorbara, L., Himmelmann, A.W., Bagdi, E., Jaffe, E.S., und Raffeld, M. (1997). Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood* **89**, 980-989.
- Kroese, F.G., Timens, W., und Nieuwenhuis, P. (1990). Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* **84**, 103-148.
- Krueger, S., Kalinski, T., Wolf, H., Kellner, U., und Roessner, A. (2005). Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Lett* **223**, 313-322.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P.C., Diehl, V., und Tesch, H. (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* **98**, 762-770.
- Küpper, M., Joos, S., von Bonin, F., Daus, H., Pfreundschuh, M., Lichter, P., und Trümper, L. (2001). MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol* **112**, 768-775.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* **12**, 4955-4967.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., und Hansmann, M.L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10962-10966.
- Küppers, R., Hansmann, M.L., Diehl, V., und Rajewsky, K. (1995). Molecular single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mol Med Today* **1**, 26-30.
- Küppers, R., und Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* **16**, 471-493.
- Küppers, R. (1999a). Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center in B-cell lymphomagenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21 Suppl 1**, S74-79.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1999b). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**, 1520-1529.
- Küppers, R., und Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-5594.
- Küppers, R., Sousa, A.B., Baur, A.S., Strickler, J.G., Rajewsky, K., und Hansmann, M.L. (2001). Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med* **7**, 285-292.
- Küppers, R. (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* **84**, 277-312.
- Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Bräuninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Califano, A., Hansmann, M.L., et al. (2003). Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* **111**, 529-537.

- Küppers, R., und Rajewsky, K. (2003). *Developmental and Functional Biology of B lymphocytes* (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins).
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262.
- Küppers, R., und Re, D. (2007). Nature of Reed-Sternberg and L&H cells, and their molecular biology in Hodgkin lymphoma. In *Hodgkin Lymphoma*, R.T. Hoppe, P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl und L.M. Weiss, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 73-86.
- Kuzu, I., Delsol, G., Jones, M., Gatter, K.C., und Mason, D.Y. (1993). Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease. *Histopathology* 22, 141-144.
- Lai, J.M., Wu, S., Huang, D.Y., und Chang, Z.F. (2002). Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13- acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol* 22, 7581-7592.
- Lam, K.P., Kuhn, R., und Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lauritzen, A.F., Hou-Jensen, K., und Ralfkiaer, E. (1993). P53 protein expression in Hodgkin's disease. *Apmis* 101, 689-694.
- Levy, D.E., und Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Li, X., Bu, X., Lu, B., Avraham, H., Flavell, R.A., und Lim, B. (2002). The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 22, 1158-1171.
- Liberg, D., und Sigvardsson, M. (1999). Transcriptional regulation in B cell differentiation. *Crit Rev Immunol* 19, 127-153.
- Lim, M.S., Beaty, M., Sorbara, L., Cheng, R.Z., Pittaluga, S., Raffeld, M., und Jaffe, E.S. (2002). T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: a heterogeneous entity with derivation from germinal center B cells. *Am J Surg Pathol* 26, 1458-1466.
- Limpens, J., Stad, R., Vos, C., de Vlaam, C., de Jong, D., van Ommen, G.J., Schuurung, E., und Kluin, P.M. (1995). Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85, 2528-2536.
- Lindström, M.S., und Wiman, K.G. (2002). Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 12, 381-387.
- Liso, A., Capello, D., Marafioti, T., Tiacci, E., Cerri, M., Distler, V., Paulli, M., Carbone, A., Delsol, G., Campo, E., et al. (2006). Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 108, 1013-1020.
- Liu, P., Keller, J.R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R.A., Nakamura, T., Jenkins, N.A., und Copeland, N.G. (2003). Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4, 525-532.
- Lorenzen, J., Hansmann, M.L., Pezzella, F., Hesse, C., Kneba, M., Gatter, K.C., und Fischer, R. (1992). Expression of the bcl-2 oncogene product and chromosomal translocation t(14;18) in Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 23, 1205-1209.
- Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M., und Levy, R. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10209-10213.
- Mack, T.M., Cozen, W., Shibata, D.K., Weiss, L.M., Nathwani, B.N., Hernandez, A.M., Taylor, C.R., Hamilton, A.S., Deapen, D.M., und Rappaport, E.B. (1995). Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med* 332, 413-418.
- MacLennan, I.C., Liu, Y.J., und Johnson, G.D. (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev* 126, 143-161.
- Maggio, E., Benharroch, D., Gopas, J., Dittmer, U., Hansmann, M.L., und Küppers, R. (2007). Absence of measles virus genome and transcripts in Hodgkin-Reed/Sternberg cells of a cohort of Hodgkin lymphoma patients. *Int J Cancer* 121, 448-453.
- Maggio, E.M., Van Den Berg, A., Visser, L., Diepstra, A., Kluiver, J., Emmens, R., und Poppema, S. (2002). Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. *Int J Cancer* 99, 665-672.

- Maggio, E.M., Van Den Berg, A., de Jong, D., Diepstra, A., und Poppema, S. (2003). Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 162, 29-35.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., und Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-4344.
- Mandell, J.W. (2003). Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology. *Am J Pathol* 163, 1687-1698.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S., und Stein, H. (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 337, 453-458.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Huhn, D., und Stein, H. (1999). Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol* 17, 3804-3809.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., et al. (2000). Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95, 1443-1450.
- Marafioti, T., Jabri, L., Pulford, K., Brousset, P., Mason, D.Y., und Delsol, G. (2003). Leucocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 120, 671-678.
- Marafioti, T., Pozzobon, M., Hansmann, M.L., Delsol, G., Pileri, S.A., und Mason, D.Y. (2004a). Expression of intracellular signaling molecules in classical and lymphocyte predominance Hodgkin disease. *Blood* 103, 188-193.
- Marafioti, T., Mancini, C., Ascani, S., Sabattini, E., Zinzani, P.L., Pozzobon, M., Pulford, K., Falini, B., Jaffe, E.S., Müller-Hermelink, H.K., et al. (2004b). Leukocyte-specific phosphoprotein-1 and PU.1: two useful markers for distinguishing T-cell-rich B-cell lymphoma from lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *Haematologica* 89, 957-964.
- Martin, I., Bonnefoix, T., Roucard, C., Perron, P., Lajmanovich, A., Moine, A., Leroux, D., Sotto, J.J., und Garban, F. (1999). Role of autologous CD4+ T cell clones in human B non-Hodgkin's lymphoma: aborted activation and G1 blockade induced by cell-cell contact. *Eur J Immunol* 29, 3188-3195.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., et al. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 1474-1477.
- Martin-Subero, J.I., Renné, C., Grohmann, S., et al. (2004). Chromosomal rearrangements affecting the BCL6, MYC and MALT1 loci are rare events in classical Hodgkin lymphoma. *Eur J Hematol* 73 (suppl 65):B23. Abstract.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., und Liu, Y.J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183, 971-977.
- Masir, N., Marafioti, T., Jones, M., Natkunam, Y., Rüdiger, T., Hansmann, M.L., und Mason, D.Y. (2006). Loss of CD19 expression in B-cell neoplasms. *Histopathology* 48, 239-246.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mechta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., et al. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* 21, 4104-4113.
- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Johrens-Leder, K., Vornlocher, H.P., et al. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 199, 1041-1052.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., Ghia, P., und Andersson, J. (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 7, 214-227.
- Metkar, S.S., Naresh, K.N., Redkar, A.A., Soman, C.S., Advani, S.H., und Nadkarni, J.J. (1999). Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 33, 521-530.
- Mohamed, M.M., und Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-775.
- Montes-Moreno, S., Roncador, G., Maestre, L., Martinez, N., Sanchez-Verde, L., Camacho, F.I., Cannata, J., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Shen, Y., Chan, W.C., et al. (2008). Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood* 111, 351-358.

- Monti, S., Savage, K.J., Kutok, J.L., Feuerhake, F., Kurtin, P., Mihm, M., Wu, B., Pasqualucci, L., Neuberg, D., Aguiar, R.C., et al. (2005). Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105, 1851-1861.
- Mottok, A., Renné, C., Willenbrock, K., Hansmann, M.L., und Bräuninger, A. (2007). Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 110, 3387-3390.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., et al. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Mueller, N.E., und Grufferman, S. (1999). The epidemiology of Hodgkin's Disease. In Hodgkin's disease, P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl, R.T. Hoppe und L.M. Weiss, eds. (Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins), pp. 61-78.
- Mukhopadhyay, S., Munshi, H.G., Kambhampati, S., Sassano, A., Plataniias, L.C., und Stack, M.S. (2004). Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 279, 33139-33146.
- Munoz, N., Davidson, R.J., Witthoff, B., Ericsson, J.E., und De-The, G. (1978). Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 22, 10-13.
- Müschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L., und Küppers, R. (2000a). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 191, 387-394.
- Müschen, M., Re, D., Bräuninger, A., Wolf, J., Hansmann, M.L., Diehl, V., Küppers, R., und Rajewsky, K. (2000b). Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res* 60, 5640-5643.
- Nagel, S., Scherr, M., Quentmeier, H., Kaufmann, M., Zaborski, M., Drexler, H.G., und MacLeod, R.A. (2005). HLXB9 activates IL6 in Hodgkin lymphoma cell lines and is regulated by PI3K signalling involving E2F3. *Leukemia* 19, 841-846.
- Natkunam, Y., Lossos, I.S., Taidi, B., Zhao, S., Lu, X., Ding, F., Hammer, A.S., Marafioti, T., Byrne, G.E., Jr., Levy, S., et al. (2005). Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. *Blood* 105, 3979-3986.
- Neuberger, M.S., und Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 7, 248-254.
- Niedobitek, G., Pazolt, D., Teichmann, M., und Devergne, O. (2002). Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EB13, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 198, 310-316.
- Nutt, S.L., und Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725.
- Oeschger, S., Bräuninger, A., Küppers, R., und Hansmann, M.L. (2002). Tumor cell dissemination in follicular lymphoma. *Blood* 99, 2192-2198.
- Ohno, T., Stribley, J.A., Wu, G., Hinrichs, S.H., Weisenburger, D.D., und Chan, W.C. (1997). Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 337, 459-465.
- Oudejans, J.J., Kummer, J.A., Jiwa, M., van der Valk, P., Ossenkoppele, G.J., Kluin, P.M., Kluin-Nelemans, J.C., und Meijer, C.J. (1996). Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 148, 233-240.
- Papavasiliou, F.N., und Schatz, D.G. (2000). Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408, 216-221.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., und Capra, J.D. (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 180, 329-339.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., et al. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11816-11821.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., und Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.

- Paterson, J.C., Tedoldi, S., Craxton, A., Jones, M., Hansmann, M.L., Collins, G., Robertson, H., Natkunam, Y., Pileri, S., Campo, E., et al. (2006). The differential expression of LCK and BAFF-receptor and their role in apoptosis in human lymphomas. *Haematologica* 91, 772-780.
- Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62.
- Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Langhoff, E., Matsumura, F., Yamashiro, S., Mosialos, G., und Said, J.W. (1997). Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* 150, 543-562.
- Poppema, S., Kaiserling, E., und Lennert, K. (1979). Epidemiology of nodular paragranuloma (Hodgkin's disease with lymphocytic predominance, nodular). *J Cancer Res Clin Oncol* 95, 57-63.
- Poppema, S. (1996). Immunology of Hodgkin's disease. *Baillieres Clin Haematol* 9, 447-457.
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria).
- Radtko, F., Wilson, A., Mancini, S.J., und MacDonald, H.R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247-253.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Ramsay, A.D., Smith, W.J., und Isaacson, P.G. (1988). T-cell-rich B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 12, 433-443.
- Re, D., Hofmann, A., Wolf, J., Diehl, V., und Staratschek-Jox, A. (2000). Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95. *Exp Hematol* 28, 31-35.
- Re, D., Müschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V., und Wolf, J. (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* 61, 2080-2084.
- Recklies, A.D., White, C., und Ling, H. (2002). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 365, 119-126.
- Reed, D. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep* 10, 133-193.
- Renné, C., Martin-Subero, J.I., Hansmann, M.L., und Siebert, R. (2005a). Molecular cytogenetic analyses of immunoglobulin loci in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma reveal a recurrent IGH-BCL6 juxtaposition. *J Mol Diagn* 7, 352-356.
- Renné, C., Willenbrock, K., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Bräuninger, A. (2005b). Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 105, 4051-4059.
- Renné, C., Martin-Subero, J.I., Eickernjäger, M., Hansmann, M.L., Küppers, R., Siebert, R., und Bräuninger, A. (2006). Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 169, 655-664.
- Renné, C., Hinsch, N., Willenbrock, K., Fuchs, M., Klapper, W., Engert, A., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Bräuninger, A. (2007). The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 120, 2504-2509.
- Reynaud, C.A., Garcia, C., Hein, W.R., und Weill, J.C. (1995). Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 80, 115-125.
- Rickinson, A.B., und Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Ringel, M.D., Hardy, E., Bernet, V.J., Burch, H.B., Schuppert, F., Burman, K.D., und Saji, M. (2002). Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2399.
- Rodig, S.J., Savage, K.J., Nguyen, V., Pinkus, G.S., Shipp, M.A., Aster, J.C., und Kutok, J.L. (2005). TRAF1 expression and c-Rel activation are useful adjuncts in distinguishing classical Hodgkin lymphoma from a subset of morphologically or immunophenotypically similar lymphomas. *Am J Surg Pathol* 29, 196-203.
- Rogozin, I.B., und Kolchanov, N.A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1171, 11-18.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Müller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltane, J.M., et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346, 1937-1947.

- Rüdiger, T., Gascoyne, R.D., Jaffe, E.S., de Jong, D., Delabie, J., De Wolf-Peeters, C., Poppema, S., Xerri, L., Gisselbrecht, C., Wiedenmann, S., et al. (2002). Workshop on the relationship between nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma and T cell/histiocyte-rich B cell lymphoma. *Ann Oncol* 13 Suppl 1, 44-51.
- Said, J.W., Sassoone, A.F., Shintaku, I.P., Kurtin, P.J., und Pinkus, G.S. (1991). Absence of bcl-2 major breakpoint region and JH gene rearrangement in lymphocyte predominance Hodgkin's disease. Results of Southern blot analysis and polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 138, 261-264.
- Sanz, I. (1991). Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147, 1720-1729.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., und Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.
- Schwarz, K., Hansen-Hagge, T., und Bartram, C. (1990). Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res* 18, 1079.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2003a). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 1505-1512.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Distler, V., Jesdinsky, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2003b). Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol Med* 9, 85-95.
- Schütze, K., und Clement-Sengewald, A. (1994). Catch and move--cut or fuse. *Nature* 368, 667-669.
- Schütze, K., und Lahr, G. (1998). Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 16, 737-742.
- Schütze, K., Pösl, H., und Lahr, G. (1998). Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44, 735-746.
- Schütze, K., und Lahr, G. (1999). Use of laser technology for microdissection and isolation. *Am Biotechnol Lab*, 24-30.
- Scott, K., und Weinberg, C. (2004). Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. *Glycoconj J* 19, 467-477.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C., und Stein, H. (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 95, 3020-3024.
- Shaulian, E., und Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.
- Shimodaira, S., Hidaka, E., und Katsuyama, T. (2000). Clonal identity of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and T-cell-rich B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 343, 1124-1125.
- Siebenkotten, G., und Radbruch, A. (1995). Towards a molecular understanding of immunoglobulin class switching. *Immunologist* 3/4, 141-145.
- Sitar, G., Brusamolino, E., Bernasconi, C., und Ascari, E. (1989). Isolation of Reed-Sternberg cells from lymph nodes of Hodgkin's disease patients. *Blood* 73, 222-229.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Trümper, L.H., von Bonin, F., Kapp, U., Patterson, B., Snow, B.E., und Mak, T.W. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 97, 250-255.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Patterson, B., Trümper, L., Kapp, U., und Mak, T.W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 618-626.
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., und Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861.
- Srinivasan, R. (1986). Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science* 234, 559-565.
- Staudt, L.M., Dent, A.L., Shaffer, A.L., und Yu, X. (1999). Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6. *Int Rev Immunol* 18, 381-403.
- Staudt, L.M. (2000). The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *J Exp Med* 191, 207-212.

- Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8, 199-205.
- Steimle-Grauer, S.A., Tinguely, M., Seada, L., Fellbaum, C., und Hansmann, M.L. (2003). Expression patterns of transcription factors in progressively transformed germinal centers and Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* 442, 284-293.
- Stein, H., Gerdes, J., und Mason, D.Y. (1982). The normal and malignant germinal centre. *Clin Haematol* 11, 531-559.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H.D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G., und Falini, B. (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* 97, 496-501.
- Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige unter den Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z Heilkunde* 19.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., und Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Su, W., Spencer, J., und Wotherspoon, A.C. (2001). Relative distribution of tumour cells and reactive cells in follicular lymphoma. *J Pathol* 193, 498-504.
- Sundeen, J., Lipford, E., Uppenkamp, M., Sussman, E., Wahl, L., Raffeld, M., und Cossman, J. (1987). Rearranged antigen receptor genes in Hodgkin's disease. *Blood* 70, 96-103.
- Suzuki, R., und Shimodaira, H. (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540-1542.
- Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., und Seto, M. (2005). Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 106, 1770-1777.
- Tam, W., und Dahlberg, J.E. (2006). miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 211-212.
- Tedoldi, S., Paterson, J.C., Hansmann, M.L., Natkunam, Y., Rüdiger, T., Angelisova, P., Du, M.Q., Robertson, H., Roncador, G., Sanchez, L., et al. (2006b). Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid-cell markers. *Blood* 107, 213-221.
- Tedoldi, S., Mottok, A., Ying, J., Paterson, J., Cui, Y., Facchetti, F., van Krieken, J., Ponzoni, M., Ozkal, S., Masir, N., et al. (2007). Selective loss of B-cell phenotype in lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *J Pathol*.
- Thomas, R.K., Kallenborn, A., Wickenhauser, C., Schultze, J.L., Draube, A., Vockerodt, M., Re, D., Diehl, V., und Wolf, J. (2002). Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 160, 1521-1528.
- Thomas, R.K., Schmitz, R., Harttrampf, A.C., Abdil-Hadi, A., Wickenhauser, C., Distler, V., Hansmann, M.L., Schultze, J.L., Küppers, R., und Wolf, J. (2005). Apoptosis-resistant phenotype of classical Hodgkin's lymphoma is not mediated by somatic mutations within genes encoding members of the death-inducing signaling complex (DISC). *Leukemia* 19, 1079-1082.
- Tinguely, M., Rosenquist, R., Sundstrom, C., Amini, R.M., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Bräuninger, A. (2003). Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. *Am J Surg Pathol* 27, 1483-1488.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H.D., und Delabie, J. (2001). The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 159, 1807-1814.
- Trümper, L.H., Brady, G., Bagg, A., Gray, D., Loke, S.L., Griesser, H., Wagman, R., Braziel, R., Gascoyne, R.D., Vicini, S., et al. (1993). Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood* 81, 3097-3115.
- Tsubata, T., und Wienands, J. (2001). B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol* 20, 675-678.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., und Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Tukey, J.W. (1977). *Exploratory Data Analysis* (Reading Massachusetts, USA: Addison-Wesley).

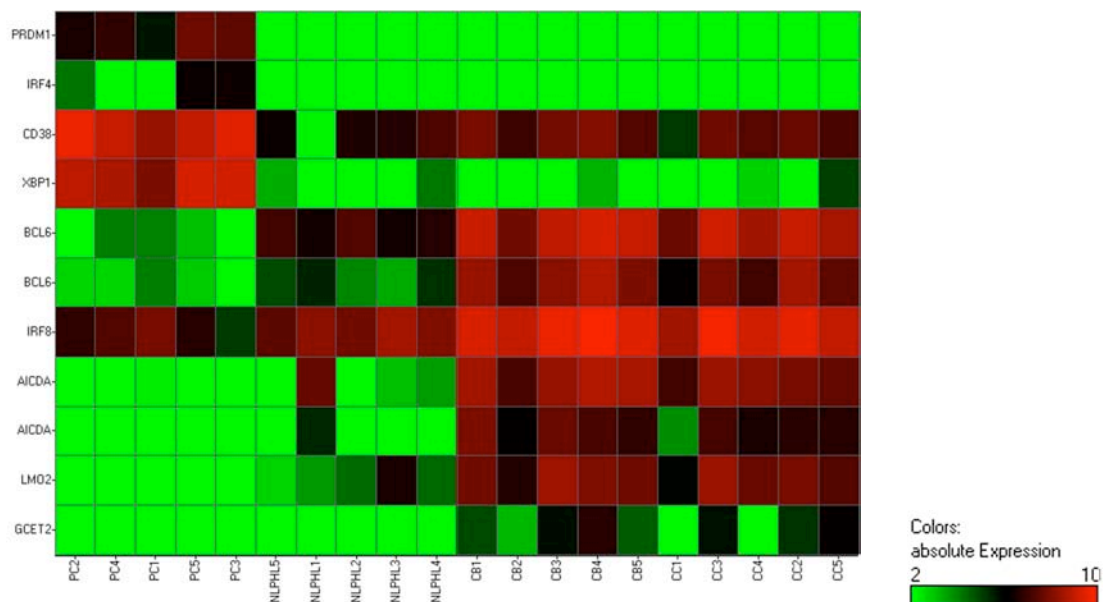
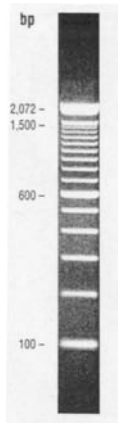
- Uherova, P., Valdez, R., Ross, C.W., Schnitzer, B., und Finn, W.G. (2003). Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. An immunophenotypic reappraisal based on a single-institution experience. *Am J Clin Pathol* 119, 192-198.
- Uherova, P., Olson, S., Thompson, M.A., Juskevicius, R., und Hamilton, K.S. (2004). Expression of c-FLIP in classic and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12, 105-110.
- Umetsu, D.T., Esserman, L., Donlon, T.A., DeKruyff, R.H., und Levy, R. (1990). Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol* 144, 2550-2557.
- Ushmorov, A., Ritz, O., Hummel, M., Leithauser, F., Möller, P., Stein, H., und Wirth, T. (2004). Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 104, 3326-3334.
- Ushmorov, A., Leithauser, F., Sakk, O., Weinhausel, A., Popov, S.W., Möller, P., und Wirth, T. (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 2493-2500.
- van den Berg, A., Visser, L., und Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 154, 1685-1691.
- van den Berg, A., Maggio, E., Rust, R., Kooistra, K., Diepstra, A., und Poppema, S. (2002). Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma. *Blood* 100, 1425-1429.
- van den Berg, A., Kroesen, B.J., Kooistra, K., de Jong, D., Briggs, J., Blokzijl, T., Jacobs, S., Kluiver, J., Diepstra, A., Maggio, E., et al. (2003). High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 20-28.
- van Rossum, A.G., Moolenaar, W.H., und Schuurin, E. (2006). Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp Cell Res* 312, 1658-1670.
- Verbeke, C.S., Wenthe, U., Grobholz, R., und Zentgraf, H. (2001). Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol* 25, 388-394.
- Vermeer, M.H., Dukers, D.F., ten Berge, R.L., Bloemena, E., Wu, L., Vos, W., de Vries, E., Tensen, C.P., Meijer, C.J., und Willemze, R. (2002). Differential expression of thymus and activation regulated chemokine and its receptor CCR4 in nodal and cutaneous anaplastic large-cell lymphomas and Hodgkin's disease. *Mod Pathol* 15, 838-844.
- Vockerodt, M., Soares, M., Kanzler, H., Küppers, R., Kube, D., Hansmann, M.L., Diehl, V., und Tesch, H. (1998). Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 92, 2899-2907.
- Wagner, K.W., Engels, I.H., und Devereaux, Q.L. (2004). Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem* 279, 35047-35052.
- Wagner, S.D., und Neuberger, M.S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 14, 441-457.
- Watanabe, K., Yamashita, Y., Nakayama, A., Hasegawa, Y., Kojima, H., Nagasawa, T., und Mori, N. (2000). Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology* 36, 353-361.
- Watanabe, M., Ogawa, Y., Ito, K., Higashihara, M., Kadin, M.E., Abraham, L.J., Watanabe, T., und Horie, R. (2003). AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 163, 633-641.
- Weber-Matthiesen, K., Deerberg, J., Poetsch, M., Grote, W., und Schlegelberger, B. (1995). Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood* 86, 1464-1468.
- Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., und Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320, 502-506.
- Weiss, L.M., Chan, J.K.C., MacLennan, K., und Warnke, R.A. (1999). Pathology of classical Hodgkin's Disease. In *Hodgkin's disease*, P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl, R.T. Hoppe und L.M. Weiss, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 101-120.

- Weiss, L.M., Warnke, R., Hansmann, M.L., Chan, J.K.C., Müller-Hermelink, H.K., Harris, N.L., Stein, H., und Jaffe, E. (2007). Pathology of Hodgkin Lymphoma. In Hodgkin Lymphoma, R.T. Hoppe, P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl und L.M. Weiss, eds. (Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins), pp. 43-71.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., und al., e. (2005). Mutations of the tumos suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Blood* 106. *Abstract*.
- Wienands, J., und Engels, N. (2001). Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function. *Int Rev Immunol* 20, 679-696.
- Willenbrock, K., Küppers, R., Renne, C., Brune, V., Eckerle, S., Weidmann, E., Bräuninger, A., und Hansmann, M.L. (2006). Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 91, 596-604.
- Wilson, K.S., Freeland, J.M., Gallagher, A., Cosby, S.L., Earle, J.A., Alexander, F.E., Taylor, G.M., und Jarrett, R.F. (2007). Measles virus and classical Hodgkin lymphoma: no evidence for a direct association. *Int J Cancer* 121, 442-447.
- Wlodarska, I., Nooyen, P., Maes, B., Martin-Subero, J.I., Siebert, R., Pauwels, P., De Wolf-Peeters, C., und Hagemeijer, A. (2003). Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 706-710.
- Wlodarska, I., Stul, M., De Wolf-Peeters, C., und Hagemeijer, A. (2004). Heterogeneity of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 89, 965-972.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mucke, S., von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H.E., et al. (1996). Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 87, 3418-3428.
- Yung, L., und Linch, D. (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361, 943-951.
- Zabel, U., Henkel, T., Silva, M.S., und Baeuerle, P.A. (1993). Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *Embo J* 12, 201-211.
- Zhang, L., Cui, R., Cheng, X., und Du, J. (2005). Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase. *Cancer Res* 65, 457-464.
- Zheng, B., Fiumara, P., Li, Y.V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J.N., Carbone, A., und Younes, A. (2003). MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 102, 1019-1027.
- Zheng, B., Georgakis, G.V., Li, Y., Bharti, A., McConkey, D., Aggarwal, B.B., und Younes, A. (2004). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res* 10, 3207-3215.

7. Anhang

Marker für die Gelelektrophorese:

100 bp Leiter



Zusätzliche Abbildung 1: Plasmazellmarker und GC-B-Zellmarker in L&H-Zellen

Die Expressionswerte verschiedener typischer Plasmazellmarker (PRDM1, IRF4, CD38, XBP1) und GC-B-Zellmarker (BCL6, IRF8, AICDA, LMO2, GCET2) in L&H-Zellen sind in einer *Heatmap* dargestellt. Spalten repräsentieren individuelle Fälle, Zeilen entsprechen den verschiedenen dargestellten Plasmazellmarkern bzw. GC-B-Zellmarkern. Die absoluten Expressionswerte sind in einer logarithmischen Scala zur Basis 2 farbcodiert. Die Profile von Plasmazellen und GC-B-Zellen sind zum Vergleich gezeigt.

Danksagung

Auf das Entstehen dieser Arbeit hatten viele Personen einen positiven Einfluss und Anteil. Die folgenden Personen möchte ich besonders erwähnen:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Küppers für die hervorragende, intensive und konstruktive Betreuung meiner Promotion, die Unterstützung, die kontinuierliche anregende Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials, die Identifizierung der Lymphomzellen, insbesondere der L&H- und HRS-Zellen, und die anregenden Diskussionen.

Besonders danken möchte Frau Dr. Ines Pfeil für die Sortierung der normalen B-Zellpopulationen, Herrn Dr. Enrico Tiacci für die Lasermikrodissektion von sechs klassischen Hodgkin-Lymphomen, Frau Susan Eckerle für die zur Verfügung gestellten Genexpressionsprofile von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und Frau Claudia Döring, Frau Dr. Anja von Heydebreck und Herrn Prof. Dr. Dirk Metzler für die Unterstützung bei den statistischen Analysen. Herrn Prof. Carel J. M. van Noesel, Herrn Prof. Dr. Brunangelo Falini und Herrn Dr. Wolfram Klapper danke ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials der Burkitt- und einiger Hodgkin-Lymphome. Herrn Dr. Detlef Güssow und Frau Melanie Kühnl von der Merck KGaA Darmstadt danke ich für die Möglichkeit des Scannens der Affymetrix Microarrays.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (KU 1315/2-1, 2-2, 5-2 und BR1238/6-1, 6-2 und 6-3) und der José Carreras Leukämie Stiftung (SP 03/11) gefördert. Für diese Förderung möchte ich mich sehr bedanken.

Für das sehr gute Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung, die erfolgreichen Kooperationen, die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und persönlichen Gespräche danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Küppers am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universitätsklinik Essen und den Mitarbeitern des Senckenbergischen Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Ganz besonders danke ich Susan Eckerle, Claudia Döring, Roland Schmitz, Enrico Tiacci, Ines Pfeil, Julia Kurth, Sabine Oeschger, Ralf Lieberz, Ewerton Marques-Maggio, Dörte Siemer, Ludger Sellmann, Jens Stanelle, Klaus Willenbrock, Knut Engels, Susanne Kriener, Reinhold Bug, Nicole Dieckert, Christiane Kehm, Tanja Schaffer-Horscht, Susanne Hansen, Kerstin Heise, Yvonne Michel, Ingrid Kremser und Ekaterini Hadzoglou.

Meine besonders tiefe Dankbarkeit gilt meinen Großeltern, meiner Mutter, meinem Mann und allen Freunden, die mich mit viel Liebe und Tatkraft während der gesamten Zeit auf vielfältige Weise unterstützt und konstruktiv begleitet haben.

Publikationen

Brune V., Tiacci E., Pfeil I., Döring C., Eckerle S., van Noesel CJM., Klapper W., Falini B., von Heydebreck A., Metzler D., Bräuninger A., Hansmann ML., Küppers R. (2008). Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis, *J Exp Med* 205 (10):2251-2268

Tiacci E., **Brune V.**, Küppers R. (2008). Aspects of gene expression in B cell lymphomas, in: *Microarrays in inflammation*, A. Bosio and B. Gerstmeyer, eds. Basel: Birkhäuser-Verlag, 151-164

Willenbrock K., Küppers R., Renné C., **Brune V.**, Eckerle S., Weidmann E., Bräuninger A., Hansmann ML. (2006). Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin lymphoma, *Haematologica* 91 (5): 596-604

Liso A., Capello D., Marafioti T., Tiacci E., Cerri M., **Distler V.**, Paulli M., Carbone A., Del Sol G., Campo E., Pileri S., Pasqualucci L., Gaidano G., Falini B. (2006). Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin's lymphoma, *Blood* 108 (3): 1013-1020

Schmitz R., Renné C., Rosenquist R., Tinguely M., **Distler V.**, Menestrina F., Stankovic T., Austen B., Bräuninger A., Hansmann ML., Küppers R. (2005). Insights into the multistep transforming process of lymphomas: IGH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas, *Leukemia* 19: 1452-1458

Küppers R., Schmitz R., **Distler V.**, Renné C., Bräuninger A., Hansmann ML. (2005). Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma, *Eur J Haematol* 75 (Suppl. 66): 26-33

Thomas RK., Schmitz R., Harttrampf AC., Abdil-Hadi A., Wickenhauser C., **Distler V.**, Hansmann ML., Schultze JL., Küppers R., Wolf J. (2005). Apoptosis-resistant phenotype of classical Hodgkin's lymphoma is not mediated by somatic mutations within genes encoding members of the death-inducing signaling complex (DISC), *Leukemia* 19: 1079-1082

Schwering I., Bräuninger A., **Distler V.**, Jesdinsky J., Diehl V., Hansmann ML., Rajewsky K., Küppers R. (2003). Profiling of Hodgkin's Lymphoma Cell Line L1236 and Germinal Center B Cells: Identification of Hodgkin's Lymphoma-specific Genes, *Mol Med* 9: 85-95

Küppers R., Klein U., Schwering I., **Distler V.**, Bräuninger A., Cattorett G., Tu Y., Stolovitzky GA., Califano A., Hansmann ML., Dalla-Favera R. (2003). Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling, *J Clin Invest* 111 (4): 529-537

Küppers R., Bräuninger A., Müschen M., **Distler V.**, Hansmann ML., Rajewsky K. (2001). Evidence that Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease do not represent cell fusions, *Blood* 97 (3): 818-821

Lebenslauf

Essen, im Juni 2008

Persönliche Daten

Verena Brune, geb. Distler
geb. 07.02.1974 in Erlangen

Schulausbildung

1980-1984 Katholische Grundschule Hörste in Lippstadt
1984-1993 Gymnasium Schloß Overhagen in Lippstadt

Akademische Ausbildung

1993-1994 Biologiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
1994-2000 Biologiestudium an der Universität zu Köln
09.1996 Vordiplom im Fach Biologie an der Universität zu Köln
06.-09.1998 Praktikum an der University of Birmingham, UK, The Medical School,
Department of Immunology (Prof. Dr. Ian MacLennan)
12.2000 Diplomabschluss am Institut für Genetik der Universität zu Köln
(AG Prof. Dr. Ralf Küppers/Prof. Dr. Klaus Rajewsky)
01.2001 Beginn des Promotionsstudiums an der Universität zu Köln
(AG Prof. Dr. Ralf Küppers)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. §6, Abs. 2, Nr.6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 23.06.2008

Verena Brune

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. §6, Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Genomweite Genexpressionsanalyse lasermikrodissektierter L&H-Zellen: Histogenetischer Ursprung und Pathogenese des nodulären lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Verena Brune befürworte.

Essen, den 23.06.2008

Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. §6, Abs. 2, Nr.8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 23.06.2008

Verena Brune